



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par : *L'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

---

Présentée et soutenue le 08/12/2016 par :

**Kévin BERTHELOT**

**Communication chimique et reconnaissance de castes chez les  
fourmis *Odontomachus hastatus* et *Lasius niger***

---

## JURY

Martin GIURFA	Professeur d'Université	Président du Jury
Patrizia d'ETTORRE	Professeure d'Université	Examinatrice
Marlène GOUBAULT	Maîtresse de Conférence	Rapporteure
Raphaël JEANSON	Chargé de Recherches	Directeur de thèse
Maria Christina LORENZI	Professeure d'Université	Rapporteure
Thibaud MONNIN	Directeur de Recherches	Rapporteur

---

**École doctorale et spécialité :**

*SEVAB : Ecologie, biodiversité et évolution*

**Unité de Recherche :**

*Centre de Recherches sur la Cognition Animale (UMR 5169)*

**Directeur de Thèse :**

*Raphaël JEANSON*

**Rapporteur-e-s :**

*Marlène GOUBAULT, Maria Christina LORENZI et Thibaud MONNIN*



# REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de thèse, Raphaël Jeanson, pour le pari risqué qu'il a bien voulu relever en acceptant de me confier la responsabilité de ce projet de thèse. Je tiens par ces quelques lignes à lui faire part de toute ma gratitude pour m'avoir formé : au comportement animal, à la réflexion scientifique, à R et à Excel, au travail de terrain (j'en oublie certainement !). Je le remercie également pour m'avoir toujours poussé et encouragé à acquérir de nouvelles compétences et de nouvelles idées et pour m'avoir soutenu pour chacun des projets qui ont constitué cette thèse. Je tiens aussi à saluer sa patience, qualité que j'ai certainement mise à rude épreuve et dont j'espère ne pas avoir trop abusé. Je terminerai par le remercier pour sa présence et sa disponibilité, à toute heure du jour ou de la nuit et pour sa générosité, en recherche comme en dehors. Enfin je tiens à lui dire que j'ai pris beaucoup de plaisir à réaliser ce projet sous sa direction.

Mes remerciements vont également aux membres du jury, Patrizia d'Ettorre, Martin Giurfa, Marlène Goubault-Body, Maria Christina Lorenzi et Thibaud Monnin qui m'ont fait le grand honneur d'accepter de juger mon travail.

Je remercie Martin Giurfa et Claire Rampon pour m'avoir accueilli au CRCA et pour m'avoir soutenu à chaque fois qu'ils en ont eu l'occasion.

Je tiens à présenter ma profonde gratitude à Jean-Louis Hemptinne et Alexandra Magro qui m'ont accueilli et permis de développer le projet sur l'écologie chimique au sein de l'ENFA. Je remercie également les nombreuses personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail et qui m'ont initié à l'acquisition de nouvelles techniques. La première personne à laquelle je pense est Felipe Ramon Portugal, qui m'a formé à l'écologie chimique et à la GC-MS et sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Depuis ma deuxième année de master j'ai pu profiter de ces grandes qualités pédagogiques et de son inventivité en matière d'explications qui m'ont aidé à ne pas baisser les bras face à une technique qui engendre parfois certaines frustrations ! Je le remercie pour sa bonne humeur et pour son travail de qualité grâce auquel nous y voyons maintenant un peu plus clair dans la chimie cuticulaire d'*Odontomachus hastatus*.

Je remercie chaleureusement Gérard Latil qui m'a initié au monde des fourmis et à leur élevage. Je le remercie pour son soutien dans l'élevage de ces chères hastatus et pour sa patience et sa bienveillance à l'égard de mes différents projets d'enrichissement des colonies d'élevage ! Enfin je tiens à le remercier également pour m'avoir initié à la vulgarisation pour les plus petits. Grâce à lui j'ai eu le plaisir de présenter mes maigres connaissances en matière de fourmis à un public plein d'enthousiasme et de questions parfois fondamentales !

Un grand merci à Alain Lenoir pour m'avoir fait bénéficier de sa grande expérience en matière de chimie cuticulaire, pour son éternel optimisme et pour sa bienveillance. Pour les multiples gourmandises à base de fourmis également !

Ma profonde gratitude va également à Patrizia d'Ettorre, qui m'a soutenu et orienté à de multiples occasions.

Un grand merci à Jérôme Orivel, qui m'a accueilli chez lui à Kourou et dont l'aide sur le terrain a été précieuse. Merci aussi à lui également pour cette première fondatrice d'hastatus qui a été le début d'une longue histoire ! En revanche, je ne suis pas certain de lui être reconnaissant pour m'avoir fait découvrir le rhum au poivre...

Merci aux membres de l'équipe IVEP, Audrey, Jean-Paul, Manon, David, Jacques et Violette, qui m'ont écouté, conseillé, lu et aidé dans mes différentes étapes de recherche. Merci aussi aux anciens membres de l'équipe, Pierre et Laurie avec qui j'ai passé de si longues heures dans ce magnifique bureau et qui m'ont également beaucoup apporté. Je remercie également Abel Bernadou pour ces commentaires précieux et son enthousiasme indéfectible et revigorant.

Je remercie Camille et Marie, les deux étudiantes que j'ai eu l'honneur et le plaisir d'encadrer.

Merci également à l'ensemble des membres du CRCA.

Merci à Manfred Ayasse, de l'Université d'Ulm, qui m'a accueilli très chaleureusement dans l'équipe d'écologie chimique du Bio 3 et qui m'a aidé à réaliser les expériences d'électroantennographie. Merci beaucoup aussi aux membres de l'équipe et du labo pour

m'avoir fait si bon accueil ! Tout particulièrement, je remercie Carlos Martel, qui a consacré beaucoup de son temps à me montrer comment fonctionnaient les différentes machines.

Mes remerciements les plus sincères vont également à l'ensemble de l'équipe pédagogique du CRCA et en particulier à : Richard Bon, Marie-Christine Miquel, Guillaume Isabel, Lionel Dahan, Christian Jost, Laure Verret, Cédric Florian, Jean-Marc Devaud, Bernard Francès et Bruno Guiard. Je remercie également Valérie Trichon, qui m'a fait confiance et qui m'a initié aux enseignements universitaires.

Je remercie Isabelle Massou pour son aide concernant les expériences de biologie moléculaire ainsi que Pierre Jean Malé pour avoir pris le temps de m'expliquer le design des amorces de microsats.

Merci à Eric Le Bourg, pour son aide et son temps ainsi que pour ses conseils et sa sollicitude.

Je remercie enfin ma famille (étendue !) et en particulier mes parents pour leur soutien inconditionnel et indéfectible depuis les premiers instants. Un grand merci également à mes grands-parents, qui ont toujours cru en moi.

A Pauline, pour sa grande patience, son soutien et sa considération en tout instant.

A mes frères et à tous mes amis où qu'ils soient !



## REMERCIEMENTS

## AVANT PROPOS

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE** **1**

<b>I. LES DÉTERMINANTS DE L'ORGANISATION SOCIALE</b>	<b>1</b>
I.A. Présentation des différents types d'organisation sociale	1
I.A.1. Cycle de vie d'une colonie et reproduction	1
I.A.2. La monogynie	3
I.A.3. Les différentes associations de reines	4
I.A.3.1 La pléométriose	4
I.A.3.2 La polygynie	7
I.A.3.3 Compétition entre reines et biais reproductif	11
I.B. Déterminants génétiques de l'organisation sociale	15
I.B.1. L'organisation sociale chez <i>Solenopsis invicta</i>	15
I.B.2. L'organisation sociale chez <i>Formica selysi</i>	17
<b>II. COMMUNICATION CHIMIQUE ET ORGANISATION SOCIALE</b>	<b>20</b>
II.A. La perception olfactive	20
II.A.1. L'antenne et les types de sensilles	20
II.A.2. Les récepteurs olfactifs	22
II.A.3. Les centres nerveux supérieurs	26
II.B. Nature et fonction des indices chimiques	30
II.B.1. Nature et mode d'étude des composés chimiques de la cuticule	30
II.B.2. Importance des classes d'HCC	35
II.C. Modèle cognitif et processus de reconnaissance	36
II.C.1. Comportement, reconnaissance et odeur coloniale	36
II.C.2. Bases neurophysiologiques de la reconnaissance coloniale	43
II.D. Informations sur statuts reproducteur et de fertilité	44

II.D.1. Fertilité, agressivité et hydrocarbures cuticulaires	44
II.D.1.1 La reproduction chez les ouvrières et le comportement de policing	44
II.D.1.2 Amines biogènes, hormone juvénile et ecdystéroïdes :lien avec l'agressivité et la fertilité	51
II.D.2. Les phéromones de reines	53
II.D.2.1 Différences du profil en HCC entre reines vraies et ouvrières	53
II.D.2.2 Signaux de fertilité : les reines manipulent-elles les ouvrières ?	56
II.D.2.3 Signaux multi-fonction et modes d'action	57
II.D.2.4 Mise en évidence des phéromones de reines chez la fourmi	58
II.D.2.5 Synergie entre CHCs et autres composés	60
II.E. Les interactions et la communication entre reines	62
<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE</b>	<b>67</b>
<b>III. PRÉSENTATION DES MODÈLES BIOLOGIQUES</b>	<b>69</b>
III.A. La fourmi <i>Odontomachus hastatus</i>	69
III.B. La fourmi <i>Lasius niger</i>	73
<b>PLAN DE LA THÈSE</b>	<b>75</b>
<b><u>CHAPITRE 1</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>CHAPITRE 2</u></b>	<b><u>103</u></b>
<b><u>CHAPITRE 3</u></b>	<b><u>117</u></b>
<b><u>CHAPITRE 4</u></b>	<b><u>145</u></b>
<b><u>CHAPITRE 5</u></b>	<b><u>163</u></b>
<b><u>DISCUSSION GÉNÉRALE</u></b>	<b><u>185</u></b>
<b>I. ANALYSE DE LA CHIMIE CUTICULAIRE ET PERSPECTIVES</b>	<b>187</b>
I.A. Etude des phéromones de reine chez <i>Odontomachus hastatus</i>	188
I.B. Etude du signal de fertilité chez <i>Lasius niger</i>	190
<b>II. INTERACTIONS ENTRE REINES CHEZ <i>LASIUS NIGER</i></b>	<b>192</b>



<b>III. L'ORGANISATION SOCIALE D'<i>O. HASTATUS</i></b>	<b>194</b>
III.A. Polymorphisme social et/ou polygynie facultative	194
III.B. Polygynie <i>versus</i> monogynie chez <i>O. hastatus</i>	194
III.C. Déterminants de la monogynie en Guyane française	196
<b>IV. PROCESSUS DE COMMUNICATION</b>	<b>199</b>
IV.A. Agressivité, fermeture coloniale et forme sociale	200
IV.B. Discrimination des castes et du statut de fertilité	201
IV.C. Interactions entre reines : retour vers de la monogynie ?	202
<b><u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>207</b>



# AVANT PROPOS

La vie en société constitue sans conteste une étape majeure de l'évolution chez les animaux. La transition vers la socialité implique de nombreuses modifications par rapport à la vie solitaire, notamment en regard des modalités de communication. L'aboutissement le plus remarquable de la vie en société s'observe chez les espèces eusociales, au sein desquelles les individus sont spécialisés en deux phénotypes principaux : une caste d'individus assurant la reproduction et une caste stérile assistant les reproducteurs et élevant leurs descendants. L'apparition de la division du travail reproductif constitue une des huit transitions évolutives majeures identifiées par Maynard Smith & Szathmary (1997). Une des caractéristiques de ces transitions évolutives concerne la fusion de plusieurs unités de reproduction en une entité qui devient la nouvelle unité de reproduction. Cette transition entraîne généralement la perte de la capacité de se reproduire des unités originelles ayant fusionné. Tel est le cas chez de nombreux Hyménoptères eusociaux où l'eusocialité (c'est-à-dire la division du travail reproductif) apparaît comme un état obligatoire. Par exemple, la totalité des espèces composant le groupe des Formicidés est contrainte à la vie eusociale, c'est-à-dire à une dépendance mutuelle stricte entre la caste stérile et la caste reproductrice. Ainsi, la nouvelle unité de reproduction, c'est-à-dire l'entité sur laquelle s'exercent les pressions de sélection, est définie par l'intégralité de la colonie, regroupant individus stériles et reproducteurs. Cependant, la transition vers un mode d'organisation à l'échelle coloniale, malgré l'interdépendance entre les individus appartenant aux deux castes, ne préserve pas les colonies de comportements égoïstes allant à l'encontre de sa productivité. Maynard Smith et Szathmàry soulignent que les mécanismes présidant à l'apparition d'un nouveau niveau d'organisation ne sont pas nécessairement ceux assurant son maintien ultérieur. Il est donc indispensable de considérer chaque transition comme le résultat de contraintes évolutives ponctuelles généralement indépendantes des mécanismes observables à plus long terme et impliqués dans le maintien du niveau d'organisation considéré.

Chez les Hyménoptères, l'haplodiploïdie\* est une caractéristique fondamentale qui a certainement modelé l'évolution de ce groupe. La conséquence principale de ce système de déterminisme du sexe est qu'une femelle partage en moyenne davantage de gènes avec sa

---

\*L'haplodiploïdie définit un système de reproduction caractérisé par une reproduction sexuée menant à la formation de femelles diploïdes et une reproduction asexuée (parthénogenèse arrhénotoque) qui mène à la production de mâles.

sœur qu'avec ses propres descendants. En 1964, Hamilton propose la théorie de la *kin selection* (ou théorie de la valeur adaptative inclusive/indirecte ou *inclusive fitness*) dont une implication majeure est qu'un individu peut augmenter sa valeur adaptative (*fitness*) en sacrifiant sa reproduction s'il contribue à augmenter la *fitness* d'un individu suffisamment apparenté. Hamilton propose ainsi que la *kin selection* pourrait permettre d'expliquer le maintien de l'altruisme reproductif de la caste ouvrière chez les Hyménoptères sociaux du fait de l'haplodiploïdie. En sacrifiant sa propre reproduction au profit de sa mère, une ouvrière peut augmenter sa valeur adaptative en contribuant à l'élevage de ses sœurs<sup>†</sup>. La théorie de l'*inclusive fitness* fait quasiment consensus comme le mécanisme principal assurant le maintien de la division du travail reproductif chez les Hyménoptères eusociaux (Abbot et coll. 2011; mais voir Korb & Heinze 2004).

Si la causalité ultime des transitions sociales chez les insectes sociaux a suscité de nombreux travaux, les mécanismes proximaux impliqués ont été relativement moins étudiés. En particulier, une conséquence majeure des transitions entre niveaux d'organisation différents implique une modification des modalités de communication entre les individus. Ainsi, la vie sociale nécessite la production de signaux spécifiques et/ou une modulation de la réponse comportementale en réponse aux signaux émis par les conspécifiques. Les Formicidés apparaissent comme un modèle pertinent pour étudier l'importance des processus de communication dans le maintien de l'organisation coloniale. En effet, toutes les espèces de fourmis sont obligatoirement eusociales et montrent une grande variabilité au niveau du nombre de reproducteurs fonctionnels à l'échelle des espèces, des populations et des colonies. Cette variabilité a été particulièrement bien étudiée d'un point de vue évolutif (Bernasconi & Strassmann, 1999; Heinze & Keller, 2000; Keller, 1995) et les processus de communication chez les fourmis ont fait l'objet de nombreuses études en neurophysiologie, écologie chimique, éthologie et cognition (Blomquist & Bagnères 2010; Gronenberg, 2008; Le Conte & Hefetz 2008; Martin & Drijfhout 2009). En altérant la structure génétique de la colonie, la présence de plusieurs reproducteurs au sein d'une colonie implique de profonds changements dans l'organisation sociale et peut être source de conflits entre les castes stérile et reproductrice (Boomsma et coll. 2014; Keller 1995).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse a été d'étudier les facteurs impliqués dans le maintien de l'organisation sociale et les processus de communication au sein du groupe des

---

<sup>†</sup> Il est important de remarquer que cette relation ne s'applique qu'à la production de femelles et pas à la production de mâles. Dans ce dernier cas, l'haplodiploïdie ne permet pas d'expliquer l'occurrence de la division du travail reproductif et l'on peut prédire au contraire l'apparition de conflits entre les castes reproductrices et stériles.

Formicidés. Pour aborder cette problématique, mes recherches ont été réalisées au laboratoire et sur le terrain et ont combiné différentes approches incluant essentiellement l'éthologie et l'écologie chimique mais également la neurobiologie. Avant de développer les résultats de ce travail, l'introduction générale présente l'organisation sociale, la communication chimique et le substrat neuro-biologique de la communication olfactive chez les fourmis. L'abondante littérature et la diversité des sujets abordés dans cette introduction m'ont conduit à faire une présentation non-exhaustive, mais que j'espère fidèle et représentative, de chaque thème. Par souci de concision, j'ai également fait le choix de me focaliser exclusivement sur les fourmis au détriment d'autres espèces d'insectes eusociaux.



# INTRODUCTION GÉNÉRALE





## I. LES DÉTERMINANTS DE L'ORGANISATION SOCIALE

### I.A. Présentation des différents types d'organisation sociale

#### I.A.1. Cycle de vie d'une colonie et reproduction

Une colonie de fourmis comprend généralement un à plusieurs individus reproducteurs, les reines, assistées par une caste d'individus stériles, les ouvrières. La ou les reines assument l'intégralité de la fonction de reproduction et les ouvrières sont en charge de l'ensemble des tâches non reproductives. Parmi ces activités, on trouve principalement les soins apportés au couvain, l'approvisionnement de l'ensemble de la colonie en nourriture, la construction, la maintenance et la défense du nid. Durant les premiers stades, la reine produit essentiellement des ouvrières qui vont permettre à la colonie de se développer. A partir d'un certain niveau de développement, lorsque le nid bénéficie d'un apport nutritionnel régulier et suffisant, la reine va produire des individus sexués généralement ailés, mâles et/ou femelles. La colonie à ce stade peut être considérée comme mature.

Les jeunes reines non inséminées produites par la reine sont appelées gynes. Ces gynes vont permettre la reproduction de la colonie. Les gynes et les mâles quittent le nid natal et dispersent pour trouver un partenaire sexuel ou bien dans certains cas s'accouplent au sein du nid natal. Une fois reproduits, les mâles meurent et les jeunes reines inséminées, appelées reines fondatrices (ci-dessous fondatrices), vont chercher un milieu adéquat pour fonder une nouvelle colonie.

Les fondatrices fraîchement inséminées possèdent plusieurs options pour fonder un nouveau nid (Figure 1). Elles peuvent fonder une colonie sans l'aide des ouvrières de leur nid natal (**fondation indépendante**) ou bien elles peuvent amener avec elles une partie de la force ouvrière de leur nid d'origine pour les aider à fonder une nouvelle colonie (**fondation dépendante** ; on parle de bouturage ou *budding*). La période durant laquelle une ou des reines élèvent leur premier couvain est appelée phase de fondation. Cette phase prend fin lorsque les ouvrières nouvellement produites sortent du nid pour aller fourrager. Généralement, les ouvrières ne sortent du nid que lorsqu'elles ont atteint un certain effectif. A partir de ce stade, on parle alors de jeunes colonies.

La phase de fondation, qu'elle soit indépendante ou dépendante, peut se faire de manière solitaire (une seule reine) ou collective (plusieurs reines fondent une nouvelle colonie

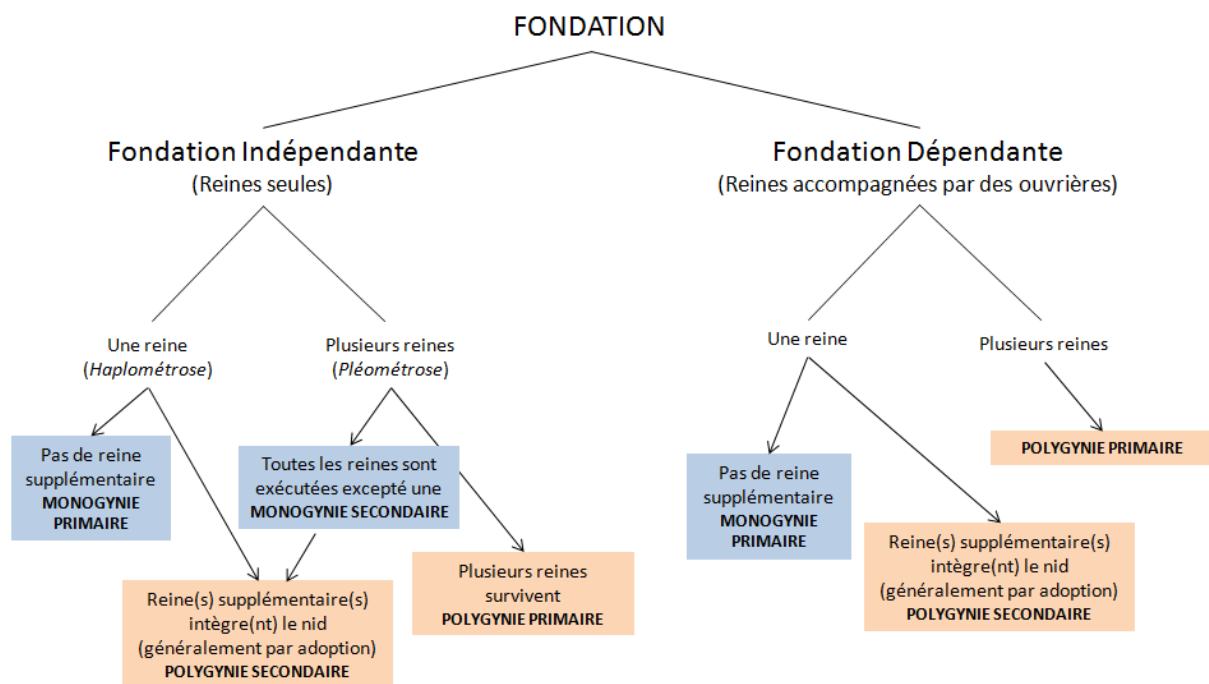
commune). Lorsque la fondation est indépendante, si la reine fonde seule on parle d'**haplométrie**, si plusieurs reines s'associent on parle de **pléométrie**.

Lorsqu'une reine fonde une colonie en haplométrie et qu'elle reste la seule reproductrice de la colonie jusqu'à sa mort, on parle de **monogynie primaire**.

Les reines au sein de fondations pléométriques (i.e. coopératives) peuvent s'engager dans des combats létaux à partir du moment où les premières ouvrières émergent de leur cocon. Une seule reine en ressort alors vivante et monopolise la fonction de reproduction du nid. La jeune colonie comprend donc une reine, dans ce cas on parle de **monogynie secondaire**.

Lorsque les reines au sein de fondations pléométriques maintiennent leur association après la phase de fondation jusqu'à leur mort, alors la colonie à l'état mature contient plusieurs reines et on parle de **polygynie primaire**.

Enfin, il arrive qu'une fondatrice, plutôt que de fonder une nouvelle colonie, tente d'intégrer un nid mature pour s'y établir. Lorsqu'une colonie mature monogyne (c'est-à-dire ne possédant qu'une reine), adopte une reine fondatrice, elle devient alors une colonie à plusieurs reines, on parle alors de **polygynie secondaire**.



**Figure 1.** Lien entre l'organisation sociale d'une colonie et son mode de fondation. Les encadrés bleus désignent les différents cas de monogynie tandis que les encadrés oranges illustrent les cas de polygynie. (D'après Hölldobler & Wilson 1977).

Il est important de mentionner qu'il existe un processus complémentaire par lequel une colonie monogyne peut atteindre un statut polygyne : la **fusion de nids matures**. Cependant ce phénomène a été bien moins étudié que la polygynie secondaire et les mécanismes sous-jacents ne sont pas très bien compris (mais voir Herbers & Tucker 1986).

### I.A.2. La monogynie

La monogynie obligatoire est définie par le fait qu'une colonie mature ne contient qu'une unique reine et qu'elle ne tolère pas la présence d'un second individu reproducteur.

Ce système semble être un caractère ancestral chez de nombreux Hyménoptères sociaux (Hughes et al. 2008). C'est aussi certainement le mode d'organisation sociale majoritaire chez les Formicidés (Boomsma et coll. 2014). La polygynie serait apparue plus tard indépendamment à plusieurs reprises au sein de ce groupe (Boomsma et coll. 2014).

Hölldobler & Wilson (1977) avancent que la monogynie est le système le plus à même de renforcer l'altruisme reproductif des ouvrières. Cette hypothèse se base sur l'observation que ce sont les ouvrières qui constituent le facteur limitant de la croissance de la colonie, pour les espèces possédant des tailles de nids modestes à modérées. Selon cette hypothèse, une reine seule est capable de pondre suffisamment d'œufs pour saturer les capacités de soin des ouvrières et donc, la présence d'une reine supplémentaire représenterait alors une perte d'énergie pour la colonie (Elmes 1973; Wilson 1974). L'intérêt de la reine est de produire des filles et des fils avec qui elle partage davantage de gènes. En conclusion, une reine et ses filles auraient tout intérêt à évincer une reine supplémentaire, même apparentée. Cette prédiction s'applique également aux fondations : on s'attend à ce que les fondations pléométriques (*i.e.* coopératives) soient instables et aboutissent au monopole de la reproduction du nid par une seule reine et donc à de la monogynie vraie ou bien à de la monogynie fonctionnelle.

La monogynie est généralement liée à différents traits dont l'ensemble constitue le syndrome de monogynie. Ces colonies sont généralement fondées de manière indépendante. Les nids matures émettent massivement des sexués ailés qui se reproduisent loin du nid au sein d'essaimage (rencontre de sexués issus de différentes colonies). Les femelles sexuées sont fortement adaptées au mode de fondation solitaire et à la dispersion : elles sont larges et lourdes car elles possèdent d'importantes réserves de glycogène et de lipides. De plus, les fondatrices tendent à rester cloîtrées lors de la phase de fondation (fondation dite claustrale), elles ne fourragent pas et élèvent leur premier couvain en utilisant leurs réserves corporelles.

Ces reines sont très fertiles (taux de ponte très élevé) et possèdent une espérance de vie de plusieurs années à plusieurs dizaines d'années (voir Bourke & Franks 1995).

### I.A.3. Les différentes associations de reines

Les associations de reines sont observables dans deux cadres distincts : la pléométrie conduisant généralement à la monogynie dans les colonies matures (voir ci-dessous) ou la polygynie décrivant la coexistence de reines dans les colonies adultes. La polygynie définit différents types d'organisations en fonction des relations entre reines.

#### *I.A.3.1 La pléométrie*

La pléométrie offre un bel exemple pour comprendre comment les associations de reines ont pu évoluer à partir d'un état ancestral monogyne. En effet, les fondations pléométriques apportent des bénéfices non négligeables pour les individus dispersant. La fondation indépendante d'un nid représente un défi considérable pour les jeunes reines dispersantes et cela se reflète dans le fort taux d'échecs lié à cette période du cycle de vie de la colonie.

La fondation indépendante (Figure 1) est généralement claustrale. Si chez quelques espèces les reines fourragent périodiquement pour apporter les nutriments nécessaires au développement du couvain (fondation non claustrale) (voir dans Bartz & Hölldobler 1982), dans la majorité des cas, les fondatrices possèdent des réserves lipidiques suffisantes pour assurer la nutrition du couvain.

Généralement, une partie des ressources est apportée par la lyse des muscles alaires, qui dégèrent à l'issue du vol nuptial et le complément de ces réserves a été stocké avant la phase de dispersion au niveau des corps gras du thorax et de l'abdomen (Wheeler & Buck, 1995). Les reines en fondation claustrale doivent faire face à un compromis entre leur propre survie et leur productivité (production d'ouvrières). De la productivité de la reine durant la période de fondation va dépendre les chances de survie de la future jeune colonie.

Dans ce contexte, l'avantage principal de la fondation associative est d'obtenir une force ouvrière conséquente en un délai plus court et pour un coût moindre en comparaison avec des nids fondés de manière solitaire (Adams & Tschinkel 1995; Bartz & Hölldobler 1982; Mintzer 1987; Sasaki et coll. 2005; Trunzer et coll. 1998; Tschinkel & Howard 1983). L'obtention d'un plus grand nombre d'ouvrières en un laps de temps court permet notamment d'améliorer les capacités de fourragement des colonies (Helms Cahan 2001) et permet une

meilleure résistance à la compétition avec les autres fondations (Adams & Tschinkel 1995; Bartz & Hölldobler 1982; Jerome et coll. 1998; Rissing & Pollock 1991) ou avec les nids matures voisins (Jerome et coll. 1998). D'autre part, la pléométrie améliore les chances de survie des reines et réduit les coûts associés aux soins du couvain ou à la construction du nid chez certaines espèces (Helms Cahan 2001).

Chez *Lasius niger*, les jeunes colonies se livrent à des raids durant lesquels les ouvrières vont voler le couvain de colonies environnantes. Ce phénomène exerce une pression sur les fondations, souvent agglomérées, dont la survie est due à la quantité d'ouvrières au sein du nid. Ces dernières peuvent, d'une part, défendre le couvain et, potentiellement, aller en dérober dans les fondations concurrentes. Les fondations pléométriques, par leur productivité importante, constituent un avantage dans ce contexte (Sommer & Hölldobler 1995). Par ailleurs, les reines au sein de ces fondations sont moins productives individuellement que les reines de fondations solitaires (Sommer & Hölldobler 1995), ce qui peut leur permettre de conserver plus d'énergie à allouer au soin du couvain (en particulier à son nourrissage).

Chez *Solenopsis invicta*, la pléométrie accélère drastiquement la production des premiers sexués et donc la reproduction de la colonie (Edward L. Vargo, 1988). Là encore, la quantité d'ouvrières est le facteur limitant la croissance des nids.

Chez la majorité des espèces, la coopération pacifique entre les reines est limitée à la phase de fondation et prend fin à l'issue de cette période. Lors de l'émergence des premières ouvrières, les reines s'engagent dans des combats létaux dont seule une d'entre elles monopolise la fonction reproductive du nid (Balas & Adams 1996; Hölldobler & Carlin 1985; Rissing & Pollock 1987). Ces colonies ne présentent donc pas de polygynie stable sauf dans quelques rares cas (rares si on rapporte leur occurrence à celle de la pléométrie chez les fourmis) de polygynie primaire dont les causes ne sont pas très bien comprises (Heinze et coll. 2001; Hölldobler & Carlin 1985; Kolmer et coll. 2002; Mintzer 1987; Trunzer et coll. 1998).

La fondation pléométrique représente donc un risque pour les reines fondatrices puisque seul un individu restera en vie à l'issue de cette phase. Du fait qu'aucun individu sexué n'est produit durant la période de fondation et que les fondatrices ne sont généralement pas apparentées, les reines qui mourront suite aux combats auront une valeur adaptative nulle. Malgré cela, l'occurrence de la pléométrie n'est pas un phénomène marginal puisqu'elle

représente plus de 50% des fondations chez de nombreuses espèces (Bernasconi & Strassmann 1999).

Les avantages liés à la pléométrie semblent surpasser le coût associé à la défaite et à la mort lors du processus de réduction du nombre de reines. Cela peut s'expliquer par les très faibles chances de succès de la stratégie alternative qui consiste à fonder une colonie de manière solitaire (haplométrie). Si la possibilité de s'accaparer la reproduction d'un nid (même en présence d'un grand nombre de co-fondatrices) est plus forte que celle de survivre à une fondation solitaire, alors la fondation collective peut être positivement sélectionnée. Les conditions environnementales vont donc jouer un rôle prépondérant en fixant le coût représenté par la fondation solitaire. Plus les conditions du milieu sont rudes (forte prédation, risque de dessiccation élevé, limitation des sites de nidification), plus la pléométrie est bénéfique en comparaison de l'haplométrie.

Pfennig (1995) montre chez *Messor pergandei* que les fondations pléométriques ne survivent pas mieux que les fondations solitaires et qu'il ne semble pas y avoir d'avantage flagrant à la coopération des fondatrices (en matière de productivité des nids). Pour expliquer ce résultat, l'auteur fait l'hypothèse que la forte proportion de pléométrie observée dans la nature chez cette espèce (jusqu'à 94% des fondations dans certaines populations pour (Cahan et coll. 1998) ; 49% des fondations pour Pfennig [1995]) est certainement due au fait que les reines limitent le temps passé à l'extérieur (qui augmente la probabilité d'être prédaté ou de mourir déshydraté) en entrant spontanément dans un trou creusé par une autre reine. Etant donné la faible chance de survie des reines, une fondatrice a de grandes chances d'hériter du nid sans même avoir à combattre une compétitrice (seuls 16% des reines survivent jusqu'à l'éclosion des ouvrières chez *M. pergandei* [Pfennig 1995]).

La coopération de reines au sein d'une fondation représente donc un phénomène particulier car elle aboutit généralement à un retour à la monogynie aux premiers stades de la colonie. Dans ce contexte, l'apparement entre les reines n'est pas un facteur important permettant la coopération. En revanche, les reines peuvent profiter de la présence d'une co-fondatrice car celle-ci augmente ses chances de survie même si une seule des deux reines restera en vie et obtiendra une valeur adaptative non nulle.

### *I.A.3.2 La polygynie*

La polygynie fait référence à l'association de reines au sein de colonies matures par opposition à la pléométrie. L'occurrence de ces associations de reines est principalement due à l'adoption de reines (polygynie secondaire). L'association peut être extrêmement stable et pérenne mais elle peut aussi, dans certains cas, être soumise à différents conflits entre les reines ou entre reines et ouvrières. On distingue deux « types » de polygynie en fonction des interactions qui existent entre les reines au sein d'une même colonie. La polygynie « vraie » consiste en l'association pacifique de reines qui contribuent également à la reproduction du nid. Il n'existe alors pas de compétition entre les reines. On trouve ce type d'organisation chez plusieurs espèces dites hautement eusociales pour lesquelles la polygynie est fortement associée à de nombreux traits de vie (Bourke & Franks 1995):

- la polygynie est obligatoire ;
- l'unicolonialité (population comprenant différentes colonies tolérantes les unes envers les autres, les frontières entre différentes colonies sont floues) ;
- un nombre élevé de reines fonctionnelles (plusieurs dizaines) et des colonies de grande taille (plusieurs milliers voire plusieurs dizaines de milliers d'ouvrières);
- un mode de fondation dépendant (par bouturage : une reine va fonder son nid avec l'aide d'ouvrières de sa colonie natale ce qui provoque un schéma de dispersion particulier : les nids adjacents sont fortement apparentés) ;
- un taux de parenté entre ouvrières très faible (car issues de reines nombreuses et non apparentées).

L'évolution de l'unicolonialité pose véritablement un problème car il est difficile de l'expliquer du point de vue de la *kin selection*. En effet, chez les espèces exprimant ce trait, le grand nombre de reines implique que les ouvrières sacrifient leur reproduction au bénéfice d'individus non apparentés. Une caractéristique importante des espèces unicloniales est que chez la plupart, les ouvrières sont totalement stériles et ne peuvent pas produire de mâles. Les arguments invoqués pour expliquer le maintien d'un tel système sont peu satisfaisants. (Keller 1995) propose que les ouvrières au sein de telles espèces pourraient avoir été piégées progressivement dans leur rôle non-reproducteur. Bourke & Franks (1995) supposent que les espèces unicloniales se sont développées dans des environnements instables où leurs traits de vie leur confèrent des avantages par rapport aux espèces monocloniales. De manière générale, les espèces unicloniales sont fortement compétitives et ont tendance à devenir dominantes écologiquement en un court laps de temps. L'unicolonialité serait donc une

organisation permettant d'accaparer des territoires massivement mais pourrait ne pas être une stratégie stable à long terme.

A l'extrémité du spectre, on observe les espèces de fourmis invasives qui portent à leur paroxysme certaines des caractéristiques citées plus haut (par exemple l'unicolonialité et le faible apparentement). Ces espèces appartiennent à différentes sous-familles de Formicidés (Myrmicines, Formicines et Dolichodérines) ce qui tend à montrer que l'évolution de ces traits s'est faite indépendamment au sein des différents groupes. Certains auteurs considèrent que les espèces invasives constituent un cul-de-sac évolutif du fait que les traits d'histoire de vie de ces colonies (en particulier le faible apparentement entre ouvrières) vont à l'encontre du maintien de la coopération des ouvrières (Helanterä et coll. 2009). Un argument intéressant soulevé par l'étude de ces espèces consiste à considérer que l'extrême degré d'unicolonialité des fourmis invasives est une conséquence d'une perte de la compétition intraspécifique, dont les effets seraient trop coûteux pour des colonies populeuses et très compétitives dont le mode de dispersion entraîne une forte densité de nid pour un même environnement (Jackson 2007). Cette hypothèse, si elle se révèle vraie, montrerait à quel point le système social d'une espèce est déterminé à la fois par sa propre histoire de vie et par les contraintes environnementales.

En revanche, il est plus facile de mettre en évidence certains des facteurs contrôlant l'adoption de reines par des nids matures dans le cadre de la multicolonialité. En effet, la multicolonialité caractérise les espèces chez lesquelles les colonies conservent une fermeture coloniale : les ouvrières des différents nids sont intolérantes aux ouvrières de nids étrangers et ce même au sein d'une même population. Les espèces multicoloniales présentent un ensemble de traits qui contrastent avec ceux des espèces unicoloniales (Bourke & Franks 1995):

- la polygynie est facultative ;
- la multicolonialité : les frontières entre différentes colonies sont bien délimitées ;
- un nombre intermédiaire de reines fonctionnelles (maximum une dizaine) et des colonies de taille modérée (plusieurs centaines à plusieurs milliers d'ouvrières);
- une stratégie de fondation mixte (dépendante et indépendante) ;
- un taux de parenté entre ouvrières moyen (intermédiaire entre celui d'une colonie strictement monogyne et celui d'une colonie polygyne multicoloniale).



L'hypothèse principale pour expliquer la transition entre l'état ancestral monogyne et l'état polygyne dérivé reprend le même raisonnement que celui développé pour expliquer l'occurrence de la pléométrie. Des contraintes environnementales spécifiques permettent de contrebalancer les coûts associés à l'érosion de la diversité génétique intra-coloniale induite par l'acceptation d'une nouvelle reine au sein d'un nid monogyne. Si la monogynie semble être le système le plus propice au maintien de l'altruisme reproductif observé au sein de la caste des ouvrières chez les Hyménoptères sociaux, la nécessité pour la colonie de survivre et de parvenir à diffuser ses gènes par la production de sexués peut altérer cette prédiction. Dans le cas où les contraintes environnementales sont fortes et ne permettent pas la fondation solitaire par les sexués produits par une colonie, celle-ci bénéficierait de leur ré-adoption pour qu'ils puissent se reproduire au sein-même de leur colonie natale. Dans ce cas, la polygynie secondaire apparaît comme une solution plus avantageuse que la monogynie. Cependant la ré-adoption de jeunes reines apparentées peut être temporaire et mener à différents scénarios permettant le retour à la monogynie (au sens stricte ou fonctionnelle). En effet les colonies polygynes peuvent se séparer en différentes propagules contenant des ouvrières et généralement une reine (on parle alors de fission, voir Cronin et coll. [2013]). Les colonies pour lesquelles la fission de la colonie est un phénomène obligatoire possèdent généralement des reines caractéristiques non ailées (dites ergatoïdes), ou encore ne possèdent pas de reines comme chez les Ponérines (Peeters & Ito 2001).

L'occurrence de la polygynie secondaire, c'est-à-dire l'adoption de jeunes reines par une colonie déjà établie, pose deux questions : (i) quels sont les avantages pour une jeune reine de se faire adopter par une colonie et (ii) quels sont les avantages apportés par l'adoption d'une nouvelle reine pour une colonie monogyne.

Herbers (1993) propose deux facteurs déterminants qui expliqueraient qu'une jeune reine bénéficie d'une adoption par une colonie mature. Premier facteur : l'absence de site de nidification disponible pour la jeune reine lors de la dispersion. L'influence de ce facteur a été mise en évidence expérimentalement chez *Leptothorax longispinosus* en manipulant le nombre de sites disponibles pour les jeunes reines dispersantes et en observant une modification du nombre de reines au sein des nids matures à la suite de cette manipulation (Herbers 1986). Bourke & Heinze (1994) offrent une synthèse du système d'organisation sociale de la tribu des *Leptothoracines* et montrent que dans ce groupe le nombre de reines au sein des nids est corrélé aux conditions environnementales. Les colonies vivant au sein d'environnements fragmentés constitués de petits patches associés à de coûts importants liés à

la fondation solitaire (i.e. avec une faible chance de succès) présentent un taux de femelles sexuées dispersantes plus faible que celui de colonies résidant dans un environnement plus uniforme, où la fondation par une femelle solitaire est moins coûteuse. L'effet de la limitation du nombre de sites de nidification semble affecter également l'occurrence de la polygynie secondaire chez *Mirmyca sulcinodis* : Pedersen & Boomsma (1999) observent que le nombre de reines par nid est cinq fois supérieur dans un habitat où les nids matures semblent occuper tous les sites potentiels en comparaison d'un autre site possédant de plus grande possibilités de nidification. Chez une autre espèce du même genre, *Myrmica rubra*, Elmes & Petal (1990) montrent que le nombre de reines au sein de colonies observées sur le terrain est fortement corrélé à la température de fin d'été. Les auteurs montrent que lorsque la température de fin d'été d'une année diffère de la température moyenne des années précédentes, les colonies de *M. rubra* possèdent alors plus de reines et plus d'ouvrières durant l'automne suivant. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ce phénomène : les colonies pourraient ajuster leur nombre de reines en fonction du climat pour conserver un ratio optimal entre reines et ouvrières ou bien, les années plus chaudes pourraient provoquer des essaimages plus massifs et induire une baisse des sites de nidification disponibles pour les fondatrices. Celles-ci seraient alors plus nombreuses à tenter d'être adoptées par des colonies matures.

Second facteur : le taux de prédation. Cet argument reprend le raisonnement de Pfennig, (1995) pour qui les fondatrices chez *M. pergandei* semblent s'associer à d'autres fondatrices ayant déjà creusé un trou pour limiter le temps d'exposition aux prédateurs ou pour éviter la dessiccation. Si le taux de prédation est très élevé, les jeunes fondatrices bénéficient d'entrer rapidement à l'abri d'un nid mature pour se soustraire à cette pression de prédation. Ce facteur n'a pas été testé expérimentalement mais demeure une hypothèse plausible.

Les bénéfices générés par l'adoption d'une reine supplémentaire pour une colonie monogyne sont moins évidents (ii). Herbers (1993) définit deux possibilités : le cas où les reines adoptées sont apparentées, le bénéfice pour la colonie adoptante étant alors compréhensible et le cas où les reines adoptées ne sont pas apparentées à la colonie d'adoption pour lequel les bénéfices sont plus subtils. Chez de nombreuses espèces, les reines adoptées sont très certainement non apparentées à la colonie d'adoption (pour une synthèse voir Herbers [1993]). Dans ce cas, la polygynie secondaire peut représenter une forme de parasitisme où les jeunes reines s'insinuent au sein de colonies matures pour exploiter la force ouvrière et produire du couvain au dépend des hôtes. Une alternative peut être que la colonie manipule la jeune reine adoptée pour qu'elle participe à la production de la force ouvrière tout en

l'empêchant de produire des sexués. Enfin, une dernière hypothèse serait que l'adoption de reines supplémentaires constitue une assurance pour la colonie en cas de perte de la reine, notamment chez les espèces où les reines peu longévives meurent avant que les individus reproducteurs n'aient eu le temps de se développer. L'adoption d'une nouvelle reine permet à la colonie de conserver sa cohésion (voir Heinze et coll. [1999]) et de permettre au couvain d'achever son développement, entraînant ainsi un gain de valeur adaptative considérable pour les ouvrières mais aussi un gain de *fitness* post-mortem pour la reine originelle (Evans 1996). Il est tout de même important de mentionner que l'adoption d'une reine non apparentée par une colonie monogyne ne représente pas forcément un coût considérable pour la colonie, tout dépend de la productivité de la reine résidente et des interactions qu'entretient la reine adoptée avec les ouvrières et avec la reine résidente.

### *1A.3.3 Compétition entre reines et biais reproductif*

Les colonies polygyes multicoloniales ne présentent pas toutes le même système de reproduction. Si les reines partagent également la reproduction au sein de colonies unicoloniales, ce n'est pas le cas pour toutes les colonies multicoloniales. En effet, les reines peuvent partager la reproduction de manière équitable comme elles peuvent également montrer des comportements de dominance dont l'expression la plus extrême se traduit par le système de monogynie fonctionnelle (plusieurs femelles inséminées au sein du nid mais une seule monopolise l'ensemble de la reproduction du nid).

Comme l'avançaient Hölldobler & Wilson (1977), une reine a tout intérêt à tenter de monopoliser la reproduction au sein du nid. De nombreuses études ont été conduites sur la compétition entre les reines et en particulier, plusieurs modèles ont été proposés pour identifier les facteurs permettant d'expliquer l'occurrence et le résultat de la compétition entre reines (en matière de part de la reproduction attribuée à chaque individu). Ces modèles de biais reproductif (« skew models ») permettent de prédire, sur la base d'hypothèses formulées sur les caractéristiques du système étudié, les facteurs pertinents pour justifier l'association ou la dissociation de groupes de reproducteurs. Dans leur forme élémentaire, ces modèles considèrent trois paramètres : les contraintes environnementales, calculées comme la productivité individuelle (nombre d'œufs se développant en ouvrières) qu'obtiendrait une reine en fondant seule sa colonie, la productivité d'une association de deux reines (généralisée ensuite à plus de deux reines) et la relation de parenté (supposée symétrique) entre ces deux reines (N reines par la suite). A partir de ces trois variables, selon les modèles

et leurs hypothèses particulières il est possible de prédire l'intensité du biais reproductif permettant le maintien de l'association des deux reines (Reeve & Keller 2001). Cependant, les hypothèses faites par chaque modèle sont différentes et souvent difficiles à vérifier. Un exemple d'hypothèses alternatives faites par ces modèles est de déterminer au sein des associations de reines si les individus sont en mesure de contrôler totalement la part de reproduction d'un compétiteur ou si le contrôle est seulement partiel (par exemple : une reine résidente pourrait contrôler totalement la part de reproduction d'une jeune reine récemment adoptée). De nombreux raffinements ont été apportés pour obtenir des modèles plus en lien avec la réalité biologique (Reeve & Keller 2001). En particulier, le coefficient de parenté supposé symétrique n'est pas toujours une hypothèse valide. Dans le cadre de l'association mère-fille (situation courante chez les Formicidés), ce coefficient n'est plus symétrique et dans ce contexte, on prédit que les filles seront neutres vis-à-vis de la production de femelles issues d'elles-mêmes ou de leur mère alors que les mères bénéficient de la production de filles plutôt que de la production de petites-filles. Ainsi le biais reproductif dans les associations mère-fille devrait être plus important que dans des associations de sœurs. Or, il semble assez probable chez les Formicidés que les jeunes reines qui arrivent à se faire adopter soient des filles de la reine résidente de la colonie adoptante car la stratégie d'adoption est généralement associée à une dispersion faible voire nulle. D'autre part, le système haplo-diploïde de détermination du sexe des fourmis (et des Hyménoptères sociaux en général) ajoute une subtilité dans la prédiction du biais reproductif en fonction que les individus associés produiront des mâles ou des femelles. En théorie, on observera un biais reproductif plus important lorsque les associations mère-fille produiront des mâles plutôt que des femelles.

Bien que de nombreuses études aient testé les prédictions de ces différents modèles chez les fourmis, aucune vision d'ensemble n'a été proposée pour expliquer la compétition entre reines (Hammond et coll. 2006). Le test de ces modèles nécessite une meilleure compréhension des relations entre reines et des mécanismes sous-jacent aux comportements agonistiques ou coopératifs observés.

La compétition entre reines au sein de colonies polygynes a été étudiée chez quelques espèces. En particulier, les *Leptothoracines* et les fourmis du genre *Myrmica* constituent de très bons modèles pour étudier ces interactions car les différentes espèces et même les colonies au sein de ces espèces possèdent une organisation sociale très flexible. On trouve chez ces modèles, tous les types d'organisation sociale possibles : monogynie obligatoire (ces

colonies n'acceptent jamais de reines supplémentaires), polygynie facultative dont certaines colonies sont fonctionnellement monogynes. Ci-dessous seront développés quelques exemples pour rendre compte des différents types d'organisation de la fonction reproductive. Chez les espèces polygynes dérivées comme les *Formica*, toutes les reines ne se reproduisent pas de manière équivalente (Hannonen et coll. 2002; Seppä 1994) cependant elles ne développent pas de comportement agressif et le biais reproducteur reflète une différence de fertilité intrinsèque entre reines (Hannonen et coll. 2002).

Chez *Leptothorax curvispinosus*, les reines sont en contact les unes des autres et ne montrent pas de comportements agressifs. En revanche, ici encore, les reines ne partagent pas la même part de reproduction et cela semble lié à la précaution des reines lors de la manipulation des œufs et à la robustesse de ces derniers (Wilson 1974). Le même type d'organisation a été décrit chez d'autres espèces de Leptothoracines : les reines partagent la reproduction sans agression et pratiquent à un taux équivalent le cannibalisme d'œufs mais elles ne semblent pas capables de différencier leurs œufs de ceux d'une autre reine (Heinze 1993).

Chez plusieurs espèces de Ponérines montrant de la polygynie, les reines possèdent généralement des différences dans leur fécondité et leur développement ovarien. Ces différences peuvent être intrinsèques (*Odontomachus rixosus* : Ito et coll. 1996) ou bien elles peuvent être corrélées à une hiérarchie de dominance établie par le biais de comportements agonistiques (*Odontomachus chelifer* : Medeiros et coll. 1992, *Odontomachus hastatus* : Oliveira et coll. 2011). Chez *O. chelifer* et *O. hastatus*, les reines obtiennent une part de reproduction correspondant à leur rang hiérarchique : les individus de haut rang assurent la plus grande part de la ponte tandis que les individus de bas rang pondent peu.

Enfin, les interactions agonistiques entre reines peuvent amener au monopole total de la reproduction par une unique reine, on parle alors de monogynie fonctionnelle.

Au sein des colonies polygynes de *Leptothorax* sp. A, les reines montrent des comportements agressifs vis-à-vis de leur compétitrices principalement durant la sortie de l'hibernation, lorsque tous les individus reproducteurs ont un développement ovarien quasi-inexistant. A l'issue de ces interactions, une reine accapare la position dominante et développe ses ovaires. Lorsque cet individu dominant atteint son plein potentiel reproducteur, les combats s'arrêtent (ou du moins se raréfient) et les reines subordonnées restreignent leur reproduction. Les reines subordonnées stériles sont soit évincées du nid par les ouvrières, soit elles restent au sein du nid et conservent un état stérile (Heinze & Smith 1990).

Une étude récente de Trettin et coll. (2014) menée chez des *Leptothoracines* montre que le comportement des reines vis-à-vis d'autres reines au sein de colonies polygynes est dépendant des conditions sociales mais peut être dépendant également, dans une moindre mesure, des conditions environnementales. En effet, les auteurs sont parvenus à déclencher des interactions agonistiques entre des reines normalement non agressives en diminuant le nombre d'ouvrières au sein de nids polygynes. Un autre traitement consistait à réduire l'apport nutritif de ces colonies polygynes pour créer un stress alimentaire (et mimer un site pauvre en ressources). Même si la tendance observée n'est pas significative, le stress alimentaire semble lui aussi entraîner une augmentation des interactions agonistiques entre les reines qui sont habituellement quasi inexistantes. Ce travail suggère que les reines au sein de colonies polygynes sont en mesure d'ajuster leur comportement aux conditions socio-environnementales de la colonie.

## I.B. Déterminants génétiques de l'organisation sociale

Chez certaines espèces socialement polymorphes, le type d'organisation sociale semble totalement ou en partie déterminé génétiquement.

### I.B.1. L'organisation sociale chez *Solenopsis invicta*

Les espèces du genre *Solenopsis* représentent le modèle biologique qui a été le plus étudié à cet égard (une synthèse des différents travaux a été réalisée dans Gotzek & Ross 2007). Au sein de ces espèces on trouve des populations monogynes et polygynes et le type d'organisation sociale est entièrement gouverné par une variation allélique au niveau du gène *General protein-9* (*Gp-9*). Chez *Solenopsis invicta* (la véritable fourmi de feu), les colonies dont les ouvrières sont uniquement porteuses de l'allèle *B* (*i.e.* homozygotes pour le gène *Gp-9*) ne tolèrent qu'un reine de génotype *BB* tandis que les colonies comprenant une proportion d'ouvrières portant à la fois l'allèle *B* et l'allèle *b* (*i.e.* hétérozygotes pour le gène *Gp-9*) tolèrent plusieurs reines si celles-ci sont de génotype *Bb*. L'organisation sociale chez *S. invicta* est entièrement déterminée par le comportement des ouvrières vis-à-vis des reines, dicté par le génotype chez ces deux castes.

De nombreuses expériences d'adoption croisée de reines et de couvain réalisées entre les deux formes sociales ont montré que les ouvrières semblent baser leur décision de rejeter ou d'accepter une reine uniquement en fonction du génotype de celle-ci (Gotzek & Ross 2007; Keller & Ross 2002; Ross & Keller 1998). Plus surprenant, ces travaux montrent que seule une faible proportion d'individus porteurs de l'allèle *b* (5 à 15%) est suffisante pour dicter une organisation sociale polygyne.

De nombreuses caractéristiques phénotypiques diffèrent entre les deux formes sociales chez *S. invicta* en plus de ce patron particulier de discrimination des reines exprimé par les ouvrières. Les reines de génotype *BB* expriment fortement le syndrome monogyne : elle sont grandes et lourdes, longévives et très fertiles et elles fondent de nouvelles colonies de manière indépendante. Les reines de génotype *Bb* sont plus légères, plus petites et moins fertiles, possèdent une espérance de vie courte et sont incapables de fonder une colonie de manière solitaire, elles tentent de se faire adopter par les nids matures de la même espèce (syndrome polygyne).

Wang et coll. (2013) montrent que l'allèle *b* est inclus dans une région chromosomique appelée *Social b supergen*, comprenant 616 gènes impliqués dans l'expression des traits

responsables du syndrome de polygynie, c'est-à-dire l'ensemble des traits phénotypiques qui caractérisent la forme polygyne. Ce supergène est qualifié d'égoïste car il est favorisé par les modifications qu'il engendre sur le phénotype de son porteur. Chez *S. invicta*, ce caractère « égoïste » se traduit par le comportement des ouvrières porteuses de l'allèle *b* qui n'accepteront que des reines porteuses de ce même allèle et qui produiront des individus qui seront eux aussi porteurs de l'allèle *b*. Il est important de noter que les deux variantes du supergène, *Social b* et *Social B*, constituent des fragments importants des chromosomes qui les portent (environ 55 %) et qu'il n'y a pas de recombinaison possible du supergène *Social b*, ni avec son homologue *Social B* ni avec lui-même. Cette absence de recombinaison a entraîné l'accumulation de mutations délétères au niveau du variant *Social b* impliquant d'une part une différence morphologique des deux variants et d'autre part le caractère non viable des individus de génotype *Sb/Sb*.

Un élément très intéressant qui caractérise le lien entre génotype et phénotype chez *S. invicta* est la réaction agonistique progressive exprimée par les ouvrières de colonies polygynes (en particulier les ouvrières portant l'allèle *b*) au cours de la maturation des jeunes reines de génotype *BB* dans les colonies polygynes. En effet les colonies polygynes peuvent produire des reines de génotype *BB* (moitié de la progéniture d'une reine *SB/Sb* appariée avec un mâle *SB*), ces dernières étant attaquées de plus en plus violemment par les ouvrières de leur propre nid. L'escalade de l'agressivité coïncide temporellement avec les changements physiologiques des gynes lors du développement de leurs ovaires (Keller & Ross 1999). A partir de cette observation, les auteurs suggèrent que l'agressivité des ouvrières pourraient être déclenchée par deux types d'informations en interaction, provenant de ces reines : une information permettant aux ouvrières de déterminer le génotype de la reine et une autre leur permettant de déterminer son statut de maturité reproductive (voir partie sur la phéromone de reine chez *S. invicta*).

Les mécanismes de la communication chimique seront abordés dans la partie suivante, cependant, pour des raisons de continuité et de compréhension, les processus de reconnaissance (dont le déterminisme semble être génétique), impliqués dans le maintien de l'organisation sociale chez *S. invicta* sont brièvement discutés ci-dessous.

Le gène *Gp-9* code pour une protéine de liaison olfactive appartenant au groupe des OBP (pour *Odorant Binding Protein*) (Krieger & Ross 2002) dont le rôle dans la communication olfactive et gustative a été particulièrement bien étudié chez les insectes (voir plus bas §x).



Plusieurs hypothèses ont été avancées postulant que la variation allélique du *Gp-9* pourrait entraîner des différences dans les processus de perception des phéromones émises par les reines de différents génotypes. Le lien entre l'augmentation progressive de la quantité d'ARNm GP-9 chez les ouvrières et l'amélioration croissante de leur capacité à discriminer les génotypes des reines renforce cette hypothèse (Gotzek & Ross [2007], p-211). Une preuve plus solide est fournie par une étude récente réalisée par Tribble & Ross (2016) qui montrent que les ouvrières portant l'allèle *b* discriminent les reines de génotype *BB* et *Bb* sur la base de leurs indices chimiques. Ce résultat révèle ainsi un « effet barbe verte » puisqu'un allèle unique augmente sa propre valeur adaptative en produisant un signal détectable (l'odeur des reines portant l'allèle *b*) tout en modifiant simultanément le comportement vis-à-vis des individus porteurs de ce signal (les ouvrières portant l'allèle *b*).

Cependant, ce résultat implique également que les ouvrières de colonies monogynes, c'est-à-dire ne portant pas l'allèle *b*, ne discriminent pas les reines de génotypes différents. Bien que cela soit cohérent avec l'hypothèse que l'allèle *b* entraîne des modifications dans les capacités de perception chez les individus porteurs et non porteurs (« effet barbe verte »), cela va à l'encontre de travaux antérieurs qui montrent que les ouvrières de colonies monogynes rejettent systématiquement les reines de génotype *Bb*. Une explication proposée par les auteurs mais qu'ils ne développent que peu serait que les ouvrières monogynes, incapables de discriminer les deux phénotypes, se baseraient sur une différence de fertilité pour accepter ou non une nouvelle reine. Étant donné que les deux génotypes des reines sont liés à deux statuts de fertilité différents (la fertilité chez les reines matures *BB* est plus importante que celle des reines matures *Bb*), la fertilité pourrait représenter un bon proxy du génotype pour les ouvrières monogynes qui de surcroît sont moins soumises à la nécessité d'adopter une nouvelle reine que leurs congénères polygynes (du fait de la longévité plus grande des reines monogynes et de l'état strictement monogyne de la colonie). À l'opposé, les ouvrières de colonies polygynes auraient développé un mécanisme pour discriminer finement les reines en fonction de leur génotype car au sein de ces colonies, l'adoption de reines peut être un phénomène fréquent.

### I.B.2. L'organisation sociale chez *Formica selysi*

De récents travaux ont révélé que l'organisation sociale d'une espèce de la sous-famille des Formicines semble être, elle aussi, sous le contrôle d'un déterminisme génétique exclusif (Purcell et coll. 2014). *Formica selysi* est une espèce socialement polymorphe où les colonies

sont monogynes, polygynes (jusqu'à 15 reines) ou dans une moindre mesure oligogynes (c'est-à-dire plusieurs reines qui ne se tolèrent pas et sont donc ségréguées dans le nid). Les colonies monogynes et polygynes diffèrent dans un certain nombre de traits associés au type d'organisation sociale (syndromes monogyne et polygyne).

L'architecture génétique de cette espèce montre un certain degré d'analogie avec *S. invicta* (Purcell et coll. 2014). En effet les auteurs ont mis en évidence un ensemble de gènes présents au niveau d'un même chromosome dont les allèles diffèrent en fonction du type d'organisation sociale. Les deux haplotypes découverts (nommés *Sm* et *Sp*) ne présentent pas de recombinaison entre eux ce qui suggère que cet ensemble de gènes forme, comme chez *S. invicta*, un supergène. Les individus au sein de colonies monogynes possèdent tous (ouvrières, mâles et reines) l'haplotype *Sm* tandis que les individus issus de colonies polygynes possèdent l'haplotype *Sp* (mâles et certaines femelles) ou bien les deux haplotypes (certaines femelles). La principale différence entre les deux espèces est le fait que chez *F. selysi* l'allèle *Sp* n'est pas létal chez les homozygotes et donc de nombreuses ouvrières arborent un génotype *Sp/Sp* alors que le génotype *Sb/Sb* est létal chez *S. invicta*. Purcell et coll. (2014) montrent également que les gènes formant le supergène social de *F. selysi* ne partagent pas d'homologies avec ceux constituant le supergène social chez *S. invicta*. Ce résultat indique une convergence étonnante de l'architecture génétique entre ces deux espèces et montre, comme l'indiquent les auteurs, que la formation de supergènes semble être un mécanisme important pour l'évolution de l'organisation sociale chez les fourmis.

Le nombre de reines au sein d'une colonie est donc un trait plastique, à la fois à l'échelle des espèces, des populations mais aussi à l'échelle des colonies elles-mêmes. Dans un article publié dans *Evolution* en 2012, Purcell & Chapuisat décrivent cette plasticité du système reproductif chez les fourmis qu'ils replacent dans un continuum présentant deux extrémités distinctes. D'un côté du spectre, l'organisation sociale d'un nid peut être entièrement déterminée par la génétique comme chez *Solenopsis invicta* ou chez *Formica selysi*, alors que de l'autre, le système est contraint exclusivement par des contraintes environnementales comme chez *Leptothorax* (Herbers 1993).

L'organisation précise de la fonction de reproduction ne dépend pas obligatoirement du nombre de reines fonctionnelles dans les colonies polygynes. En revanche, les interactions comportementales entre ces dernières vont entièrement déterminer le type de système reproductif de la colonie. De plus, la présence de plusieurs reines au sein d'un nid peut être

transitoire et diffère de la polygynie « vraie » qui est définie par une interaction stable et pérenne et une absence de compétition entre reines. Les ouvrières peuvent influencer le système de reproduction du nid par leur possibilité d'accepter ou refuser la présence d'une reine (nouvelle ou non), par leurs interactions avec les reines ou par leur comportement vis-à-vis du couvain de ces reines. Dans le contexte de la polygynie secondaire, on peut donc distinguer deux phases déterminantes pour expliquer le nombre de reproducteurs effectifs (c'est-à-dire le nombre de reines qui pondent) au sein d'un nid<sup>‡</sup>: la phase d'adoption de la reine supplémentaire, soumise aux contraintes environnementales et à la décision des ouvrières du nid résident, et la phase d'interactions entre la nouvelle reine et la reine résidente qui va déterminer la part de reproduction du nid allouée à chacun de ces individus.

Pour chacune de ces phases, les processus de communication entre individus semblent être déterminants pour comprendre le résultat des interactions comportementales. On peut également se demander si les différentes issues observées au cours de ces deux phases (acceptation/rejet de la reine, présence/absence de biais reproductif) reposent sur des mécanismes de reconnaissance et de perception différents. La question est alors de déterminer si les mécanismes de reconnaissance et de perception varient en fonction des contextes (traits d'histoire de vie, contraintes environnementales).

---

\* Cette dichotomie est évidemment trop simpliste pour rendre compte de l'intégralité du système de régulation de la reproduction cependant elle constitue une première approximation et par la suite, chaque phase pourra être étudiée en détail de manière à prendre en compte tous les raffinements nécessaires.

## II. COMMUNICATION CHIMIQUE ET ORGANISATION SOCIALE

Un avantage apporté par le modèle fourni vient de la compréhension croissante que nous avons des processus de communication au sein de ce groupe (Liebig 2010; Ozaki & Hefetz 2014; Sturgis & Gordon 2012). Comme chez la plupart des arthropodes, l'essentiel des interactions entre individus chez les fourmis repose sur l'échange d'informations olfactives. Pour conserver l'intégrité de la colonie et permettre son fonctionnement harmonieux, les individus utilisent des indices chimiques émis par leurs congénères. L'organisation sociale, qui fait intervenir des processus de communication entre la caste ouvrière et les reines ainsi qu'entre les reines, nécessite un transfert d'informations reflétant les différentes caractéristiques des individus. Le statut de fertilité des individus, celui des ouvrières et de la reine, semble un élément primordial dans ce contexte (Peeters & Liebig 2009). En effet, il est nécessaire que les individus reproducteurs communiquent leur statut et leur productivité aux individus stériles pour permettre une division efficace des tâches.

Les composés impliqués dans ces processus de communication semblent être constitutifs de la cuticule des individus ou bien produits activement au niveau de glandes exocrines variées présentes principalement sur les pattes, le thorax et la tête (Billen & Morgan 1998; Blomquist & Bagnères 2010). L'intégration des indices chimiques passe par le système nerveux périphérique (*i.e.* l'antenne) où il subit un premier processus d'intégration avant d'être relayé vers les centres nerveux supérieurs. Une classe particulière de composés chimiques a été mise en avant chez les Hyménoptères sociaux pour son implication dans la régulation des interactions sociales : les hydrocarbures cuticulaires (Blomquist & Bagnères, 2010).

### II.A. La perception olfactive

#### II.A.1. L'antenne et les types de sensilles

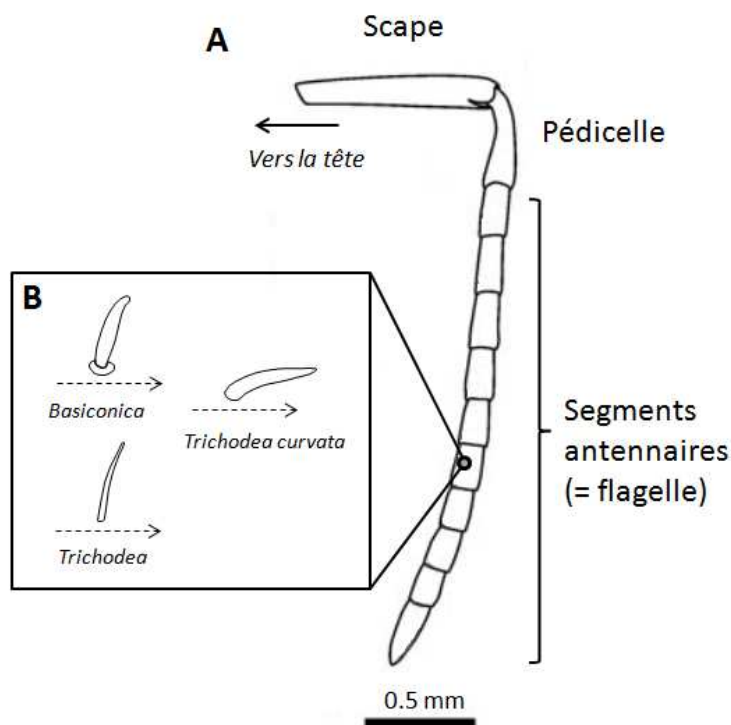
Les molécules ou bouquets de molécules sont captés par l'antenne, centre de la perception olfactive, au niveau de centaines, voire de milliers de sensilles olfactives recouvrant les différents segments du flagelle antennaire (Figure 2). Ces dernières sont classées en divers types morphologiques auxquels sont associées différentes fonctions. Huit types différents ont été décrits jusqu'ici : *chaetica*, *tricodea curvata*, *basiconica*, *trichodea*, *trichoid-II*, *ampullacea*, *coeloconica* et récemment *coelocapitular* (Ramirez-Esquivel, Zeil, & Narendra, 2014). Une sensille peut posséder un élément cuticulaire qui fait saillie au niveau de

l'antenne (c'est le cas pour les cinq premiers types mentionnés) ou bien elle peut être imbriquée dans la lumière de celle-ci et présenter une ouverture à l'aspect de pore à la surface du flagelle (c'est le cas des trois derniers types cités). La structure générale d'une sensille est globalement la même pour l'ensemble des types : un élément permettant de capter et canaliser un stimulus est attaché à la cuticule par l'intermédiaire d'une structure en « chaussette » ou bien sort de la cuticule au niveau d'une invagination de celle-ci (Figure 2). La structure des sensilles est adaptée à leur fonction : les sensilles impliquées dans l'olfaction sont donc trouées de multiples pores permettant le captage de molécules odorantes tandis que celles en charge du captage de l'information mécanique ont une structure en forme de cheveux (*hair-like*) (Figure 3). Il est important de préciser que si l'on observe une grande concentration de sensilles au niveau de l'antenne, ces éléments sont présents également sur l'ensemble du reste de la cuticule d'un individu. Ainsi, bien que les capacités d'olfaction d'une fourmi se concentrent essentiellement au niveau des antennes, d'autres parties du corps peuvent traiter une information olfactive.

Le rôle des différents types de sensilles a été mis en évidence pour la plupart d'entre eux à partir d'expériences d'électrophysiologie parfois couplées à l'étude du comportement des individus. Ramirez-Esquivel et coll. (2014) proposent une synthèse de ces différents rôles : le type *chaetica* semble impliqué dans la mécano-réception, le type *ampullacea* serait assigné à la perception de la chaleur et du CO<sub>2</sub>, le type *coeloconica* fonctionnerait comme un détecteur de la pression atmosphérique et le type *coelocapitular* représenterait des récepteurs hygrométriques et thermiques. Les *sensilla basiconica* semblent être des chémo-récepteurs de contact qui pourraient être impliquées dans le traitement des hydrocarbures cuticulaires (Ozaki et al., 2005). Les *sensilla trichodea* sont considérées comme ayant la même fonction en partie du fait de leur association courante avec les *sensilla basiconica*.

Chez *Solenopsis invicta*, les individus issus de castes différentes (ouvrières, reines et mâles) ne possèdent pas le même nombre de sensilles (tous types confondus) et les différences les plus marquées sont liées au sexe des individus (Renthal et coll. 2003). Cela suggère qu'il peut exister des différences de perception entre des individus de castes différentes, en particulier entre femelles et mâles, ces derniers présentant une histoire de vie très différente de celle des femelles. Autre résultat intéressant chez *S. invicta* : les ouvrières et les reines possèdent le même nombre de *sensilla basiconica*, ce qui suggèrent des capacités de perception d'éléments non-volatils similaires chez ces deux castes.

Une récente étude de Sharma et coll. (2015) a réalisé des enregistrements de l'activité électrique au niveau de sensilles basiconiques et montre que ces dernières peuvent être subdivisées en sous-types en fonction de leur spectre de sensibilité à différentes familles d'hydrocarbures.



**Figure 2.** A Représentation schématique d'une antenne et de ces différentes sections. B Représentation schématique de trois sensilles de type différent. Les flèches en pointillé représentent l'axe de l'antenne. Les sensilles ne sont pas représentées à l'échelle.

Comme le remarquent Ramirez-Esquivel et coll. (2014), les études ayant caractérisé les sensilles olfactives chez différentes espèces de fourmis ont utilisé des méthodes différentes de comptage appliquées sur des segments antennaires différents ou sur des faces différentes de ces derniers. Il est donc difficile d'établir une carte de la répartition des types sensillaires qui soit représentative de l'ensemble du groupe des Formicidés ou plutôt de tenter d'établir des similarités entre les différentes espèces.

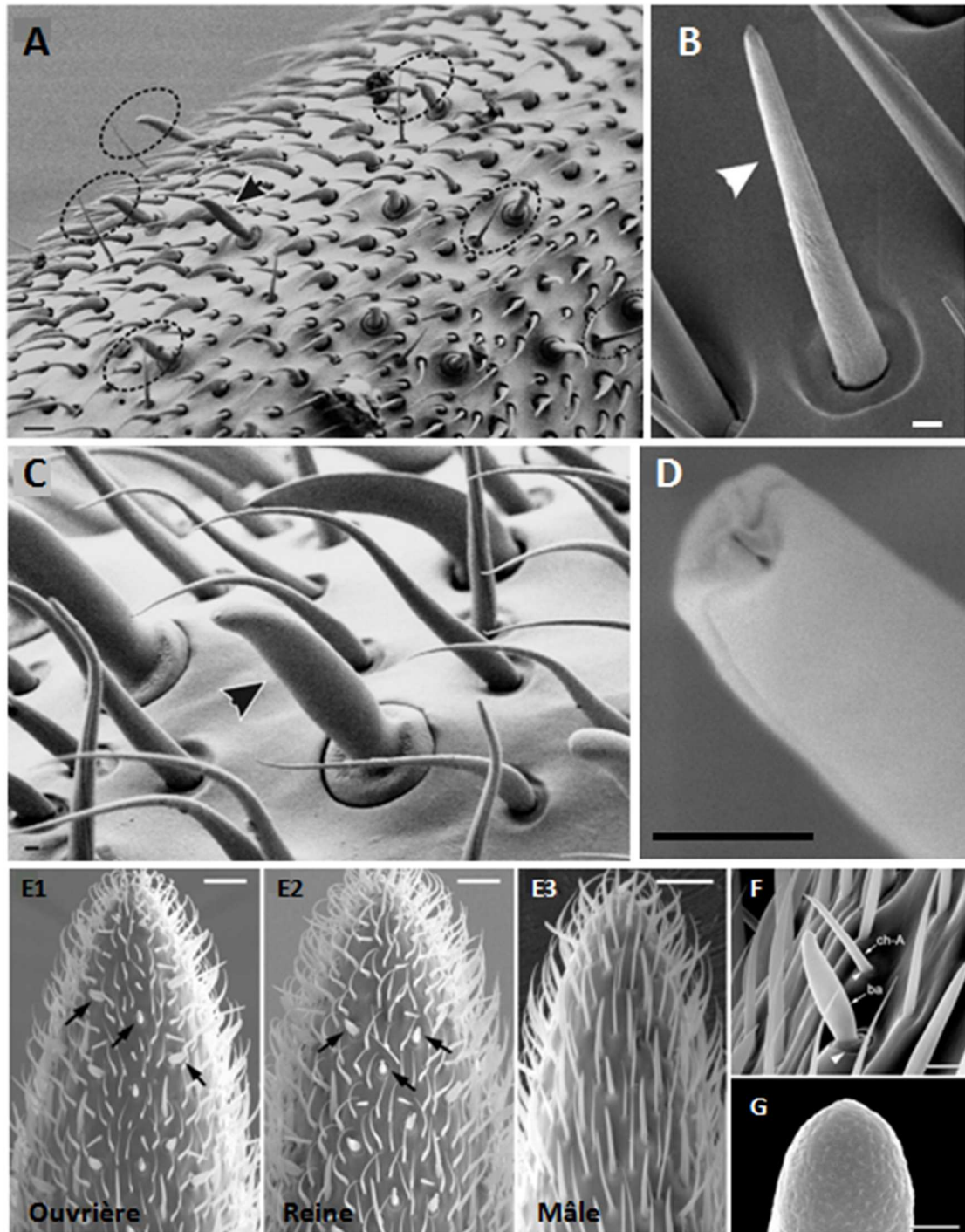
### II.A.2. Les récepteurs olfactifs

A l'intérieur de la sensille et selon son diamètre, on observe un nombre variable de neurones (dendrites), baignant dans un liquide appelé lymphe sensillaire. Les *sensilla basiconica* abritent un très grand nombre de ces neurones (entre 130 et 200) en comparaison des autres

types de sensilles (Nakanishi et coll. 2009; Ozaki et coll. 2005). Cette observation constitue un élément supplémentaire pour alimenter l'hypothèse que le type sensillaire *basiconica* est sûrement impliqué dans la captation des molécules chimiques peu volatiles. Au vu de la complexité des informations chimiques (odeurs constituées de bouquets de molécules) qui doivent être appréhendées par un individu, la présence de nombreux ORNs exprimant des récepteurs olfactifs variés peut sembler approprié.

Les dendrites contenues dans les sensilles sont les éléments distaux des neurones olfactifs récepteurs (ORNs pour *Olfactory Receptor Neurons*) qui expriment, au niveau de leur membrane, les récepteurs olfactifs (OR pour *Olfactory Receptors*) responsables du captage des molécules chimiques. Ces neurones projettent leurs axones sur les lobes antennaires (AL= *Antennal Lobe*), premiers relais du système nerveux central.

Les récepteurs olfactifs possèdent une spectre de sensibilité variable selon leur type et ils sont généralement regroupés par type fonctionnel au sein d'une même sensille (Hallem et coll. 2006). Lorsqu'une espèce chimique s'introduit par les pores d'une sensille olfactive, elle est captée vraisemblablement par une protéine de liaison (OBP pour Odorant Binding Protein) qui permet sa solubilisation et son transport jusqu'à l'OR correspondant. La liaison de la molécule (ou du complexe OBP/molécule) avec le récepteur olfactif entraîne une dépolarisation de la membrane dendritique qui en réaction génère les potentiels d'action dont la fréquence de décharge constitue l'information neurale. De nombreuses études anatomo-fonctionnelles du système olfactif indiquent que l'antenne est organisée en unités fonctionnelles à partir des sensilles olfactives jusqu'aux centres nerveux supérieurs (pour une synthèse chez l'abeille voir Galizia & Rössler 2010). Chaque sensille abrite des récepteurs olfactifs généralement spécifiques d'une même famille de ligands.



**Figure 3.** Structure de *sensilla basiconica* et *sensilla trichodea* observées en microscopie électronique chez *Myrmecia pyriformis* (A-D) et *Camponotus japonicus* (E-G). **A** : Colocalisation de *sensilla basiconica* (sensille épaisse) et *sensilla trichodea* (apparence de poil) au niveau des cercles pointillés. **B** : *sensilla trichodea*. **C** : *sensilla basiconica* (flèche noire). **D** : Extrémité d'une *sensilla trichodea*. **E1-E2** : Extrémité de l'antenne d'une ouvrière (E1), d'une reine (E2) et d'un mâle (E3) chez *C. japonicus*. Les flèches noires indiquent les *sensilla basiconica* (absentes chez les mâles). **F** : *sensilla basiconica*. **G** : extrémité d'une *sensilla basiconica* dont on distingue les pores. Echelles (barres): A = 10 $\mu$ m ; B,C et D = 1 $\mu$ m ; E1-E3 = 20 $\mu$ m ; F = 5 $\mu$ m ; G = 0.5 $\mu$ m. (D'après Ramirez-Esquivel et coll. [2014] (A-D) et Nakanishi et coll. [2009] [E1-E3,F et G]).



Le lobe antennaire est organisé en multiples *glomérules* qui sont considérés comme les unités fonctionnelles de cet organe. De forme sphérique, les glomérules sont formés par l'agrégation de nombreuses synapses (on parle de neuropile) établies entre les ORNs et les neurones propres au lobe antennaire. Les glomérules constituent le premier centre d'intégration de l'influx nerveux issu de nombreux ORNs, raison pour laquelle les lobes antennaires sont considérés comme le centre de représentation de l'information olfactive. Pour cette raison, le lobe antennaire fait l'objet d'un intérêt particulier car il est considéré comme l'organe permettant aux fourmis d'appréhender leur environnement chimique et donc comme l'élément principal impliqué dans les processus de reconnaissance et de communication indispensables à l'organisation de la vie coloniale.

Chez la drosophile (comme chez les vertébrés), les ORNs exprimant les mêmes types de récepteurs (c'est-à-dire spécifiques d'un même ligand) projettent essentiellement sur le même glomérule (Vosshall et coll. 2000; Wang et coll. 2003). Chez la fourmi, même s'il n'existe pas encore de preuve formelle, on considère aussi que les glomérules reçoivent l'information issue de neurones exprimant les mêmes récepteurs olfactifs ou du moins présentant le même spectre perceptif (c'est-à-dire une sensibilité à des molécules communes).

Le fait que le système de communication chez les Formicidés repose en grande partie sur des informations olfactives se reflète dans le grand nombre de glomérules que l'on observe dans le lobe antennaire au sein de ce groupe : plus de 400 chez les individus du genre *Camponotus* (Nakanishi et coll. 2010; Zube et coll. 2008).

L'essentiel des informations disponibles sur les connections entre les différents éléments du système olfactif et leurs rôles respectifs dans la perception d'odeurs phéromonales et non-phéromonales chez la fourmi proviennent d'études réalisées chez *Camponotus floridanus* (Zube et coll. 2008) et *Camponotus japonicus* (Nakanishi et coll. 2010). Les axones des différents ORNs forment deux nerfs antennaires (un ventral et un dorsal) qui se réorganisent en deux branches à l'entrée des lobes antennaires. Une des branches se divise en quatre faisceaux sensoriels (appelés T1, T2, T3 et T6 [T = tract]) qui projettent chacun sur un amas gloméculaire distinct (appelés respectivement *glomeruli T1, T2, T3 et T6*) tandis que l'autre branche se divise en trois faisceaux sensoriels (*T4, T5 et T7*) projetant sur les glomérules correspondants (appelés respectivement *glomeruli T4, T5 et T7*). Chaque lobe antennaire est donc organisé en sept amas gloméculaires (soit sept sous-régions). Chacun d'entre eux possède un nombre différent de glomérules qui est approximativement le même chez les femelles (reines et ouvrières) mais inférieur (ou égal pour certains amas) chez les mâles

(Nakanishi et coll. 2010). L'amas glomérulaire T6 possède par exemple environ 140 glomérules, Nakanishi et coll. (2010) suggèrent que les sensilles de type *basiconica*, qui logent approximativement 130 ORNs pourraient être liées spécifiquement à la région T6. Les auteurs basent cette hypothèse sur plusieurs observations : d'une part la forte corrélation entre le nombre de neurones dans une sensille basiconique et le nombre de glomérules composant l'aire T6, d'autre part sur le fait que les mâles chez *C. japonicus* ne présentent ni ce type de sensille, ni l'aire T6.

L'activité des glomérules en réponse à la présentation de phéromones chez *C. obscuripes* suggère que celles-ci sont traitées par une zone spécifique du lobe antennaire (Yamagata et coll. 2006). En revanche, les odeurs non phéromonales déclenchent un patron d'activité distribué sur un ensemble de glomérules chez *C. floridanus* (Zube et coll. 2008). Cependant, les auteurs tirent cette conclusion en observant la réponse déclenchée par le n-undécane (un alcane linéaire composé de 11 carbones absent du profil cuticulaire de l'espèce étudiée) au niveau des glomérules des zones T1, T2 et T3 du lobe antennaire et il n'est fait aucune mention du patron d'activité dans les quatre zones supplémentaires. Hors, d'après l'hypothèse de Nakanishi et coll. (2010), la zone T6 pourrait être impliquée dans l'intégration de l'information provenant des HCC. Toujours selon cette hypothèse, les patrons d'activité dans les autres régions (autre que T6) pourraient être d'importance moindre pour la représentation de l'odeur dans le lobe antennaire.

Au sein du lobe antennaire, l'information olfactive est transmise à un réseau local de neurones (appelés *inter-neurones* ou *neurones locaux*) puis transférée aux neurones de projection (*PNs* pour *Projection Neurons*) qui relaient l'information aux centres nerveux supérieurs. Chez l'abeille, les neurones locaux possèdent une activité excitatrice (ils sont alors cholinergiques) ou bien inhibitrice (GABA) qui module l'activité des glomérules (Galizia & Rössler 2010). Leur rôle dans la régulation de l'activité du lobe antennaire n'a pas été mis en évidence chez la fourmi (à notre connaissance).

### II.A.3. Les centres nerveux supérieurs

Les connections entre les lobes antennaires et les centres nerveux supérieurs ont fait l'objet de peu de travaux chez les fourmis. Cependant l'étude anatomique des corps pédonculés (*mushroom bodies*), une des structures supérieures majeures chez les insectes, montre de fortes similarités et quelques divergences entre abeilles et fourmis soulignant à nouveau l'importance de l'olfaction dans ce deuxième taxon. Les corps pédonculés sont impliqués

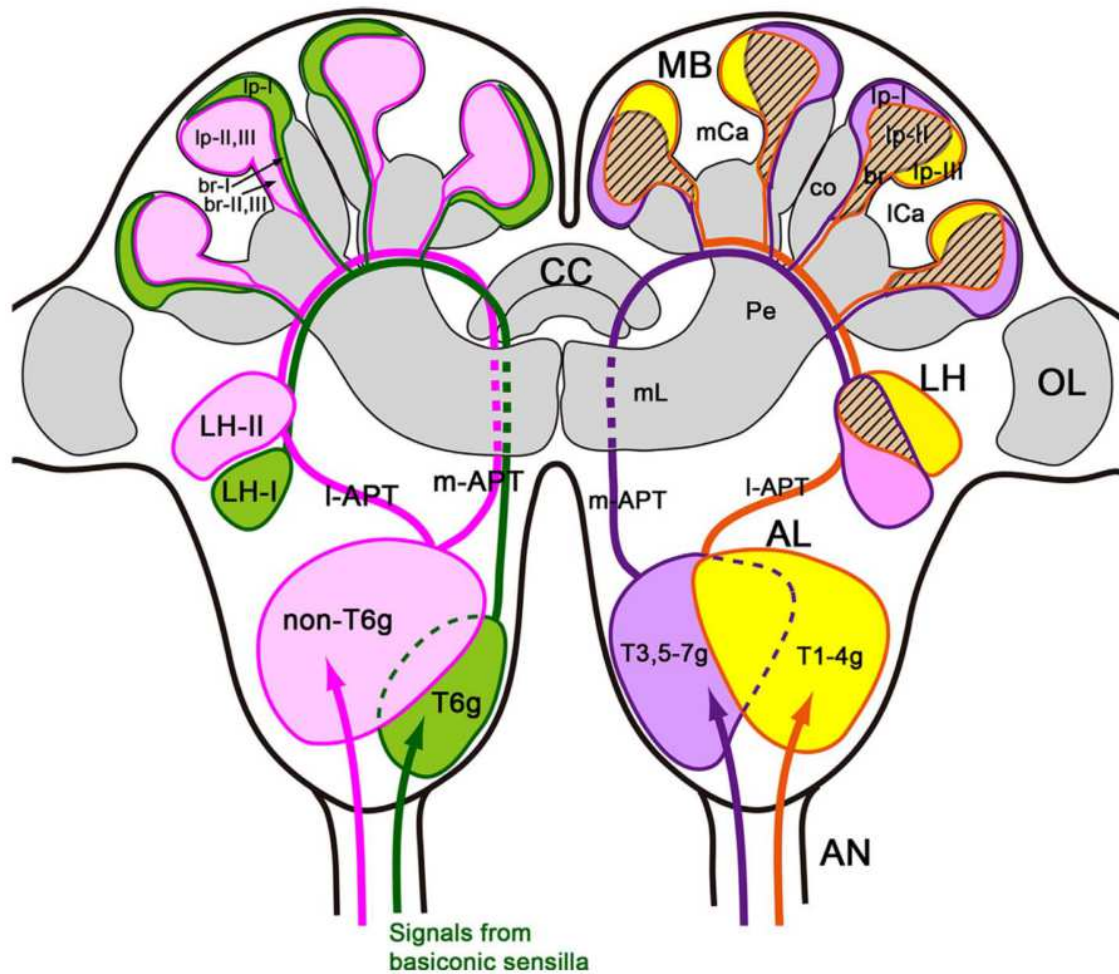
dans les processus de mémoire chez l'insecte (Heisenberg 2003) et constituent le centre terminal d'intégration de l'information permettant à l'individu d'ajuster son comportement en fonction des stimuli environnementaux. Cette structure est particulièrement développée chez les Formicidés mais aussi, du fait de la grande variation morphologique inter- comme intra-spécifique des individus de ce groupe, elle présente des différences en fonction des espèces et des tâches accomplies par les individus (Gronenberg 1999). Comme chez les autres Hyménoptères, la zone d'afférence des corps pédonculés est divisée en trois régions : la lèvre (*lip*) qui reçoit les afférences provenant des lobes antennaires, le col (*collar*) qui traite les influx nerveux provenant des lobes optiques et l'anneau basal (*basal ring*) qui reçoit les axones des neurones des lobes antennaires et optiques. Ces trois zones sont définies par les synapses créées entre les neurones de projection et les cellules de Kenyon (*KC* pour *Kenyon Cells*) qui sont des neurones relativement petits au fort potentiel d'intégration. Les Formicidés possèdent des corps pédonculés bien développés (environ 130 000 cellules de Kenyon chez *Camponotus rufipes*, Ehmer & Gronenberg [2004]) pouvant représenter jusqu'à 40% du volume cérébrale.

Les cellules de Kenyon forment des boutons synaptiques avec les neurones de projection issus des centres sensoriels primaires (lobes antennaires et olfactifs). Chez les Formicidés, les synapses formées par les *PNs* et les *KC* au niveau de la lèvre (information olfactive) sont plus larges, possèdent plus de vésicules (transfert plus rapide de l'influx nerveux) et moins d'éléments post-synaptiques que celles formées au niveau du col (information visuelle). Le fait de posséder plus d'éléments post-synaptiques est un indicateur d'une forte transmission de l'information qui peut se faire au dépend d'une meilleure intégration de celle-ci par les *KC* en charge de l'information visuelle. *A contrario*, les *KC* de la lèvre, comprenant moins d'éléments post-synaptiques pourraient ainsi procéder à une intégration plus intensive de l'information olfactive (Seid & Wehner 2008). D'autre part, chez les fourmis, certaines *KC* dites bifides possèdent des dendrites au niveau de la lèvre et du col (influx olfactifs et visuels). Ce type de cellules bimodales n'a semble-t-il jamais été mis en évidence chez l'abeille (Ehmer & Gronenberg 2004).

Les *PNs* projettent également sur la corne latérale - structure supérieure qui a été peu décrite chez la fourmi (Nishikawa et coll. 2012)-, via leurs collatérales. L'information olfactive parcourt donc une sorte de boucle. Partant du lobe antennaire, elle est en partie intégrée par les cellules de Kenyon au niveau des corps pédonculés puis elle continue vers la corne latérale du protocérébron où s'achève son trajet.

Les neurones de projection définissent deux voies de circulation de l'information nerveuse, appelées faisceaux antennoprotocérébraux latéral (*l-APT* pour *lateral-AntennoProtocerebral Tract*) et médial (*m-APT* pour *medial-AntennoProtocerebral Tract*) caractérisés par leur position respective par rapport à l'orientation du cerveau (Zube et coll. 2008). Ces deux voies (ci-dessous voies *l-APT* et voie *m-APT*) semblent être ségréguées sur l'ensemble du parcours de l'information nerveuse, comme chez l'abeille (Galizia & Rössler, 2010). Les *PNs* peuvent être répartis en deux hémisphères représentant chacun 50% du lobe antennaire dont les efférences respectives forment les deux voies *l-* et *m-APT*. La voie *l-APT* est issue des amas glomérulaires T1 à T4 et projette sur la corne latérale du protocérébron puis sur deux zones délimitées de la lèvre du corps pédonculés (appelées l-II et l-III pour *lip-II* et *lip-III*). La voie *m-APT* est issue des amas glomérulaires T3, T5, T6 et T7 et elle projette sur une zone délimitée de la lèvre du corps pédonculés (appelées l-I pour *lip-I*) puis sur la corne latérale du protocérébron (Nakanishi et coll. 2009; Rössler & Zube 2011; Zube et coll. 2008). La région T3 est donc divisée en deux parties. Ces deux voies sont incomplètement ségréguées et montrent des zones de recoupement au niveau des corps pédonculés et de la corne latérale (Figure 4, droite).

Une étude récente de Nishikawa et coll. (2012) chez *C. japonicus* propose une organisation complémentaire du lobe antennaire qui serait propre aux femelles et traiterait spécifiquement les informations sociales. Les résultats de leur étude neuro-anatomique montrent que les neurones de projection dans le lobe antennaire délimitent deux zones : une zone T6 (*glomeruli* T6) et une zone non-T6 (regroupant les 6 autres *glomeruli*). Les *PNs* issus de la région T6 (véhiculant l'information sociale issues des sensilles de type *basiconica*) constituent une voie *m-APT* projetant sur deux zones délimitées au niveau de l'anneau basal (une zone appelée *br-I* pour *basal ring I*) et de la lèvre (une zone appelée l-I pour *lip-I*) et entendant des collatérales vers une partie précise de la corne latérale (appelée *LH-I* pour *Lateral Horn I*). A l'inverse, les *PNs* issus de la zone non-T6 (i.e. issus des cinq autres amas glomérulaires) constituent une voie *l-APT* projetant sur quatre zones délimitées au niveau de l'anneau basal (deux zones appelées *br-II* et *br-III* pour *basal ring II* et *III*) et de la lèvre (deux zones appelées l-II et l-III pour *lip-II* et *lip-III*) et entendant des collatérales vers une zone précise de la corne latérale (appelée *LH-I* pour *Lateral Horn I*). Ces deux voies sont clairement ségréguées sur l'ensemble du trajet nerveux (Figure 4, gauche).



**Figure 4.** Schéma des connexions nerveuses associées au traitement de l'information captée par les antennes. **A gauche :** présentation des deux voies (T6 et non-T6) de traitement de l'information antennaire proposée par Nishikawa et coll. (2012). La voie T6 (en vert) reçoit l'information (sociale) issue des *sensilla basiconica*. Cette information est transmise via une voie *m-APT* vers la zone *lip-I* de la lèvre du corps pédonculé puis vers la zone *LH-I* de la corne latérale du protocérébron. La voie non-T6 (en rose) reçoit l'information (non sociale) issue de tous les types de sensilles. Cette information est transmise via une voie *l-APT* vers les zones *lip-II* et *lip-III* de la lèvre du corps pédonculés puis vers les zones *LH-II* et *LH-III* de la corne latérale du protocérébron. **A droite :** organisation générale du traitement de l'information antennaire. Voie *m-APT* (en violet): les *PNs* issus des amas glomérulaires T3, T5, T6 et T7 projettent sur la zone *lip-I* de la lèvre du corps pédonculés puis au niveau de la corne latérale du protocérébron. Voie *l-APT* (en jaune): les *PNs* issus des amas glomérulaires T1 à T4 projettent sur les zones *lip-II* et *lip-III* de la lèvre du corps pédonculés puis vers la corne latérale du protocérébron. Les zones hachurées correspondent à des régions où les voies *l-* et *m-APT* se confondent (Nishikawa et coll. 2012; Zube et coll. 2008). LA : lobe antennaire, CN : corne latérale, LO : lobe optique, NA : nerf antennaire, CC : complexe central. (D'après Nishikawa et coll. 2012).

En conclusion, les Formicidés possèdent un système de perception de l'information olfactive fortement développé et similaire en de nombreux points à celui particulièrement bien décrit de l'abeille à miel (*Apis mellifera*) (Rössler & Zube, 2011). Les caractéristiques principales spécifiques au cerveau des Formicidés (en comparaison avec celui de l'abeille) semblent être d'une part, l'orientation préférentielle des structures vers le traitement de l'information olfactive (au détriment peut-être du traitement de l'information visuelle) et l'importance (en volume et nombre d'unités fonctionnelles) allouée aux corps pédonculés dont on suppose leur implication dans l'expression de la plasticité comportementale (Gronenberg 2008).

Certaines structures du cerveau des fourmis ne sont pas mentionnées dans cette introduction car elles ont été très peu étudiées chez la fourmi et car les connaissances que nous avons provenant d'autres modèles semblent montrer qu'elles ne sont pas fondamentalement liées à la perception olfactive (Gronenberg 2008).

A la suite de cette synthèse (brève et non exhaustive) sur les substrats neurobiologiques de la perception olfactive chez la fourmi il convient de présenter l'état des connaissances sur les composés utilisés lors des processus de communication au sein du groupe des Formicidés. La partie suivante est donc consacrée à la présentation des indices chimiques utilisés lors de ces processus.

## **II.B. Nature et fonction des indices chimiques**

### **II.B.1. Nature et mode d'étude des composés chimiques de la cuticule**

La cuticule des arthropodes est composée de deux principales couches qui recouvrent l'épiderme : l'épicuticule, plus externe et plus fine (1-2  $\mu\text{m}$ ) et la procuticule plus épaisse (plusieurs centaines de microns) et plus interne. L'épicuticule est principalement composée de lipides qui forment une barrière hydrophobe permettant de lutter contre la dessiccation (Lockey 1979).

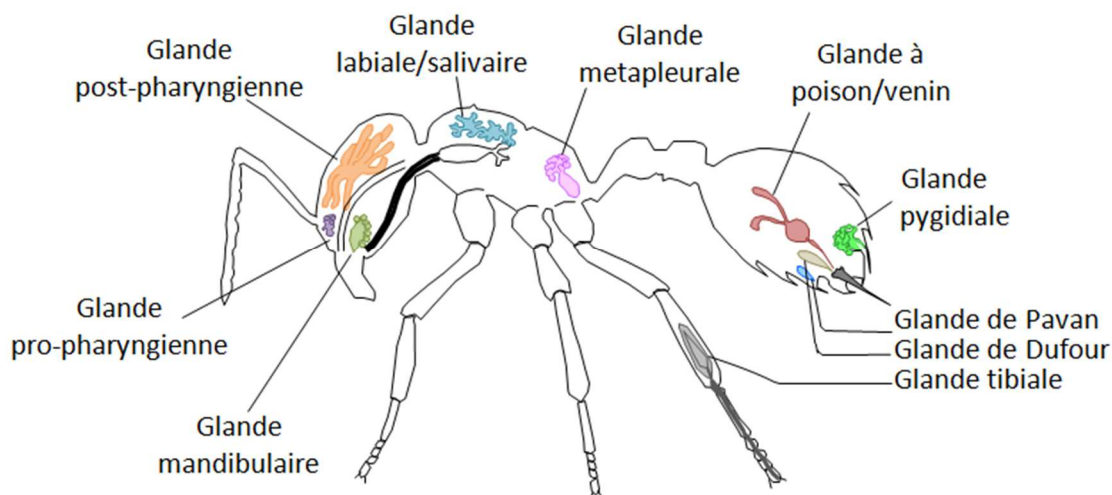
On distingue la fraction polaire (composés hydrophiles) de la fraction apolaire (composés fortement hydrophobes). Parmi les composés qui constituent la cuticule des arthropodes, on trouve majoritairement des hydrocarbures, des acides gras, des esters, des aldéhydes, des cétones et des alcools ainsi que quelque rares composés cycliques comme le cholestérol (Hadley 1981). La simplicité de la structure des hydrocarbures (chaîne de carbones hydrogénée) fait de ces composés des éléments précurseurs pour la formation de composés dérivés (dont les dérivés oxygénés).

Les hydrocarbures cuticulaires (ci-dessous HCC) ont reçu une attention toute particulière depuis leur découverte à la fin des années 60 car ils représentent un pourcentage considérable (50-75%) des lipides recouvrant la cuticule et semblent être impliqués dans de nombreux processus biologiques dont la communication chimique.

Plusieurs décennies d'études multidisciplinaires de ces composés ont mené à une compréhension intégrée mais toujours relativement incomplète des principaux aspects de leur biosynthèse au niveau de structures spécifiques (les oenocytes) et des mécanismes cataboliques à l'origine de leur grande diversité, de leur transport à travers l'hémolymphe par la lipophorine (protéine présente dans l'hémolymphe) et de leur dépôt, plus ou moins spécifique en fonction de leur nature, au niveau de différents sites dont la surface de l'épicuticule (Blomquist & Bagnères 2010).

Un second élément important de la cuticule est la présence de glandes exocrines internes dont les canaux traversent les différentes couches lipidiques pour venir s'ouvrir à la surface de l'épicuticule. Chez les Formicidés, la diversité de ces glandes est extrêmement importante ce qui a valu aux fourmis leur surnom « d'usines chimiques » (63 glandes de nature différente chez les Hyménoptères sociaux dont 39 décrites chez les fourmis selon Billen & Morgan [1998]) (Figure 5). Certaines glandes régulent en partie la répartition des éléments chimiques constitutifs de la cuticule et sont impliquées dans les processus de communication chimique (voir plus bas). On peut invoquer le nombre de glandes exocrines, particulièrement élevé chez les insectes sociaux, dont environ deux tiers ont été décrites chez les Formicidés qui s'avère être le seul groupe, chez les Hyménoptères sociaux, dont la totalité des espèces connues sont eusociales obligatoires.

L'implication des hydrocarbures cuticulaires dans les processus de reconnaissance a été mise en évidence très tôt à travers des expériences de comportement chez les Formicidés. En 1999, Lahav et coll. réalisent des tests de reconnaissance coloniale en manipulant le profil cuticulaire chez *Cataglyphis niger*. En appliquant des extraits de la fraction polaire ou non polaire de la glande post-pharyngienne (GPP, voir suite) d'individus issus d'une colonie A sur des individus issus d'une colonie B, les auteurs mesurent l'agressivité des individus issus de la colonie B lors de la présentation des individus au profil cuticulaire modifié.



**Figure 5.** Représentation des principales glandes décrites chez la fourmi. (D'après Billen & Morgan [1998]).

Ils constatent alors que les individus au profil modifié déclenchent l'agressivité des membres de leur propre colonie lorsque l'on leur a appliqué des extraits de la fraction non polaire de la GPP d'individus étrangers à la colonie mais non lors de l'application extraits de la fraction polaire. Ils en concluent que la reconnaissance coloniale fait intervenir les hydrocarbures cuticulaires qui sont les composants majoritaires de la fraction non polaire des éléments cuticulaires. Il est important de souligner que chez *C. niger*, la GPP présente sensiblement la même composition en HCC que le profil cuticulaire (Soroker et coll. 1995).

Ce résultat a fortement dirigé l'attention sur les hydrocarbures comme composants principaux responsables de la reconnaissance chez les fourmis (et même chez les Hyménoptères sociaux en général). De plus, en étudiant les interactions comportementales entre individus chez les fourmis, on constate généralement que les réactions comportementales des individus sont systématiquement précédées par un contact antennaire, ce qui suggère que les processus de reconnaissance font intervenir des molécules peu volatils. Brandstaetter et coll. (2008) ont montré chez la fourmi charpentière *Camponotus floridanus* que la discrimination entre membres du nid et étrangers pouvait s'opérer sans contact de l'antenne jusqu'à une distance de 1cm chez cette espèce. Ce résultat suggère que les composés à l'origine de la discrimination sont effectivement peu volatils.

On peut distinguer deux champs de recherche différents dans l'étude des processus de reconnaissance, bien que ces derniers soient intimement liés et complémentaires. Une première voie a pour objectif de comprendre les mécanismes de traitement des composés pertinents pour aboutir à une réponse comportementale donnée : ce domaine allie des études



neurophysiologiques et éthologiques. La seconde facette s'attache à identifier les composés du profil cuticulaire utilisés lors des processus de reconnaissance. Ce domaine fait intervenir des expériences intégrant l'écologie chimique et l'éthologie.

Il est important de remarquer que l'ensemble du profil en hydrocarbures cuticulaires n'a pas obligatoirement vocation informative. Chez les fourmis, le profil cuticulaire est composé d'un mélange, plus ou moins complexe, d'hydrocarbures cuticulaires de nature différente. Ces derniers sont répartis en classes et en séries homologues différentes. La classe définit le type de liaisons (double, simple ou triple) qui lient les atomes de carbones ainsi que la nature des groupements fonctionnels portés par ces atomes (groupement méthyle, éthyle...) et leur nombre (mono-, di-, tri-méthyle...). Une série homologue constitue l'ensemble des composés de même nature différant dans la longueur de leur chaîne carbonée. Par exemple le pentacosane (n-C<sub>25</sub>), l'hexacosane (n-C<sub>26</sub>) et l'heptacosane (n-C<sub>27</sub>) font partie de la même série homologue tandis que le 3-méthylepentacosane (3-MeC<sub>25</sub>), le 3-méthylehexacosane (3-MeC<sub>26</sub>) et le 3-méthyleheptacosane (3-MeC<sub>27</sub>) font aussi partie d'une même série homologue différente de la précédente.

Les hydrocarbures les plus simples sont les *n*-alcanes, chaînes hydrocarbonées linéaires dont la nature chimique est déterminée uniquement par la taille (c'est-à-dire par le nombre de carbones constituant la chaîne). Ces alcanes peuvent subir une méthylation sur un ou plusieurs carbones (mono- ou poly-méthylalcanes). L'emplacement du ou des groupements méthyles permet une multitude de combinaisons et donc une grande quantité de molécules très différentes produites par une même voie de biosynthèse. Les alcanes méthylés sont les composés les plus représentés chez les fourmis étudiées jusqu'ici (Martin & Drijfhout 2009), et parmi eux les di-méthylalcanes sont extrêmement représentés. Un deuxième grand groupe d'hydrocarbures est formé par les chaînes carbonées comportant une à plusieurs insaturations (doubles liaisons). En plus de l'emplacement de la double liaison qui amène une grande diversité au sein de ce groupe, chaque molécule possède deux configurations stéréochimiques (Z ou E) qui représentent deux composés différents.

On considère le profil cuticulaire de manière générale comme l'ensemble des composés dont la taille de la chaîne hydrocarbonée comprend au moins 21 carbones. En deçà de cette taille, les hydrocarbures sont considérés comme volatiles et donc ne pouvant pas être constitutifs de la cuticule. Il n'existe pas de limite supérieure à la taille des chaînes hydrocarbonées si ce n'est celle imposée par les équipements de détection classiques qui se situe généralement

entre 35 et 40 carbones. Les nouvelles techniques développées ces dernières années (spectrométrie MALDI-TOF) ont permis de mettre en évidence des composés extrêmement lourds (généralement insaturés) comportant jusqu'à 49 carbones (chez la fourmi coupeuse de feuilles *Atta colombica*, voir Cvačka et coll. [2006]); chez la fourmi charpentière *Camponotus rufifemur*, voir Menzel et coll. [2008]). Le rôle de telles molécules dans la communication reste à élucider.

Il est important de considérer la nature chimique et les contraintes de biosynthèse des hydrocarbures pour analyser leur rôle informatif. D'une part car l'étude de ces composés est en grande partie déterminée par leur identification, ce qui implique qu'une mauvaise connaissance de la nature des composés entraînera des erreurs dans l'identification des HCC de la cuticule. D'autre part, l'identification de la fonction des HCC passe généralement par l'utilisation d'analyses multi-variées qui permettent de ségréger des groupes d'individus sur la base de leur profil cuticulaire. Cette première étape permet d'isoler des composés candidats selon le principe suivant : si les composés  $X_i$  à  $X_j$ , sélectionnés parmi l'ensemble des composés du profil cuticulaire ( $X_1$  à  $X_n$ ), permettent de ségréger les groupes A et B, et que ces deux groupes diffèrent au niveau d'un caractère fixé par l'expérimentateur (appartenance coloniale, âge, sexe, ...), alors les composés ainsi sélectionnés peuvent être liés à ce trait et sont potentiellement utilisés par les individus pour discriminer entre des congénères possédant différentes valeurs du trait en question.

Du fait que les analyses multi-variées nécessitent souvent un très grand nombre d'individus échantillonnés par rapport au nombre de composés chimiques utilisés, ces méthodes apparaissent difficiles à mettre en place. van Zweden & D'Ettorre (2010) proposent une méthode alternative pour déterminer de manière simple les composés qui constituent de bons candidats pour signaler une information biologique. Ces auteurs proposent de calculer un *Diagnostic Power (DP)* permettant de déterminer la probabilité qu'un composé indique une différence entre différents groupes au sein d'une population. Cet indice évalue, pour un composé donné, la variance de sa concentration/quantité au sein de l'échantillon total par rapport à la variance (de la concentration/quantité) moyenne au sein de chaque groupe. En effet les auteurs soulignent qu'un composé permettant de signaler l'appartenance à un groupe, devrait être plus variable entre les groupes considérés qu'au sein d'un groupe lui-même. Dans ce contexte, une forte valeur de *DP*, obtenue pour un composé donné, indique que ce composé présente les bonnes caractéristiques pour signaler l'appartenance à un groupe.

Cependant ces méthodes restent corrélatives puisqu'elles ne prennent aucunement en compte la capacité de perception des individus. Un composé peut constituer un bon candidat pour indiquer un trait d'après son *DP* et ne pas être perçu par les individus du fait de l'absence de récepteurs appropriés.

La seconde étape consiste alors à conduire des bio-essais durant lesquels on manipule la quantité des HCC candidats dans l'espoir de modifier, de manière contrôlée, la valeur du trait étudié. Une difficulté repose dans la complexité du profil cuticulaire produit par certaines espèces. La manipulation de ce profil nécessite alors d'en identifier les différentes composantes et d'être en mesure de les synthétiser séparément.

### II.B.2. Importance des classes d'HCC

Les composés constituant une même série homologue sont issus de processus de biosynthèse similaires, ce qui implique que leur concentration sont souvent corrélées dans les extraits cuticulaires. En revanche, des hydrocarbures de classes différentes sont généralement issus de processus de biosynthèse différents et leurs concentrations sont donc indépendantes. Cette caractéristique est intéressante car elle permet hypothétiquement d'utiliser différentes natures de composés pour encoder différentes informations biologiques. Par exemple des individus dont les tâches impliquent des environnements différents (intérieur ou extérieur du nid) vont potentiellement avoir des profils cuticulaires différents du fait de l'influence de l'environnement sur certaines classes d'HCC (Wagner et coll. 2001). Il est alors nécessaire que la reconnaissance coloniale passe dans ce cas par des composés insensibles à l'environnement et donc très certainement des composés d'une autre classe que ceux qui varient avec les changements de milieu.

Les travaux de Martin, Drijfhout et leurs collaborateurs chez la fourmi *Formica exsecta* offrent un très bel exemple des rôles informatifs complémentaires joués par des composés de classes différentes. *F. exsecta* possède un profil en HCC relativement simple composé majoritairement d'une série homologue d'*n*-alcane ( $C_{23} - C_{29}$ ) et d'une autre série homologue d'*n*-alcène ( $C_{23:1} - C_{29:1}$ ) comprenant une double liaison au carbone 9 (position *cis*). Dans une première étude, les auteurs montrent que les alcènes seuls sont impliqués dans le processus de reconnaissance coloniale en synthétisant l'intégralité du profil en HCC et en modifiant les proportions des différents alcènes ou alcanes avant de les présenter à des ouvrières pour observer leurs réactions (Martin et coll. 2008). De plus, les auteurs montrent que les alcanes et alcènes chez *F. exsecta* possèdent une production indépendante puisque les

quantités des composés appartenant aux deux classes ne sont pas corrélées. Dans une seconde étude, ils montrent que les alcanes, bien qu'ils ne servent pas dans le processus de reconnaissance coloniale, sont spécifiques de la tâche accomplie par les individus (Martin & Drijfhout 2009b).

Cependant une étude antérieure sur la reconnaissance coloniale chez la fourmi *Formica japonica* montre que chez cette espèce l'association des alcanes linéaires et des alcènes est nécessaire pour permettre le processus de reconnaissance (Akino et coll. 2004). Cependant, dans cette étude, les auteurs synthétisent également un profil artificiel mais ne fournissent pas de comparaison entre les profils synthétisés et les profils naturels de *F. japonicus*, il n'est donc pas possible de savoir si le profil recréé est fidèle ou non à l'original.

## II.C. Modèle cognitif et processus de reconnaissance

### II.C.1. Comportement, reconnaissance et odeur coloniale

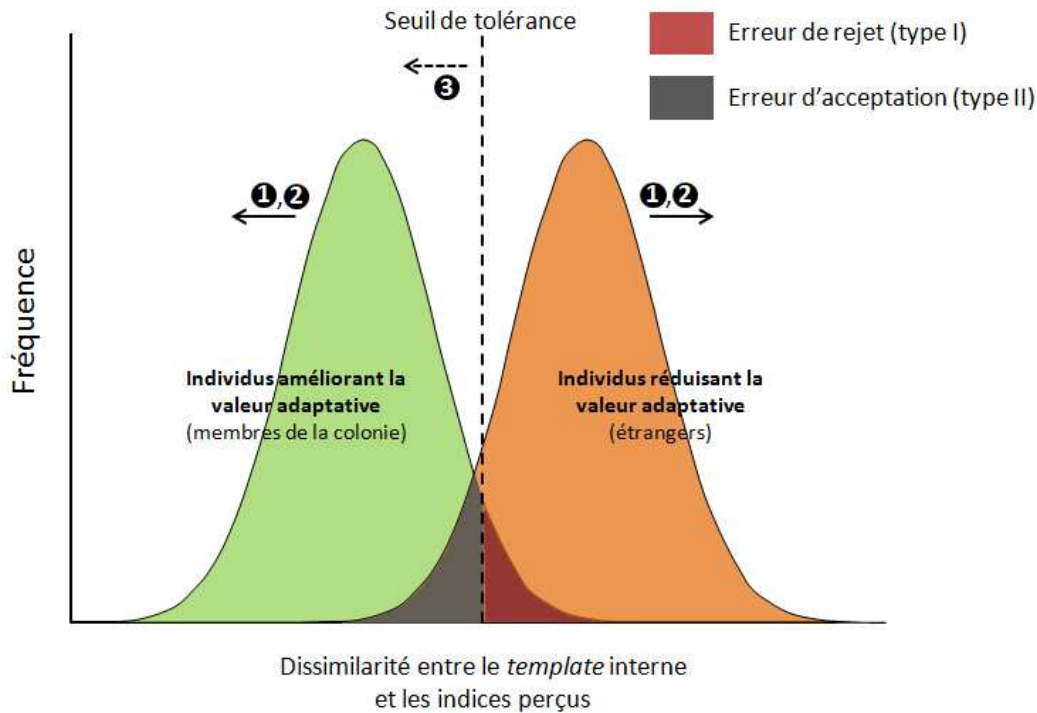
Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment les individus parviennent à discriminer les membres de leur colonie par rapport aux intrus. La reconnaissance coloniale (ou *nestmate recognition*) sera développée dans les lignes suivantes car c'est le système de reconnaissance le plus étudié chez les fourmis et qu'il est très certainement impliqué dans la régulation de l'organisation sociale. En effet, il fournit une information relativement fiable sur la proximité génétique des individus, une information nécessaire au maintien de l'intégrité coloniale (deux individus issus d'une même colonie ont en moyenne plus de chance d'être apparentés que deux individus issus de colonies différentes). En l'absence de possibilité d'opérer de la discrimination d'apparentés (la *kin recognition* n'a pas été mise en évidence de manière générale chez les fourmis, mais voir Hannonen & Sundström [2003]) la *nestmate recognition* peut apparaître comme une alternative satisfaisante.

Le modèle qui semble aujourd'hui faire consensus est celui de la Gestalt : les individus d'une même colonie produisent une odeur coloniale en échangeant leurs hydrocarbures individuels, soit passivement par simple contact, soit activement par le biais de trophallaxies (échange de nourriture liquide) et/ou de toilettes prodigués à d'autres individus du nid. La glande post-pharyngienne (GPP), située en arrière de la capsule céphalique, joue un rôle prépondérant dans ces échanges du fait qu'elle stocke les hydrocarbures exogènes et endogènes et communique avec le tube digestif et donc peut permettre l'incorporation d'hydrocarbures lors d'échanges de nourriture de même que l'élimination de composés indésirables. Il a été

montré que la composition en hydrocarbures de la GPP est très proche de celle de l'odeur coloniale. En effet, la composition du profil cuticulaire est hétérogène entre les différentes parties du corps d'un individu (Lenoir et coll. 2009; Wang et coll. 2016). Seulement, par des nettoyages permanents et/ou des trophallaxies, en utilisant les HCC stockés dans sa GPP, un individu met à jour constamment sa propre odeur et participe à la diffusion de cette odeur chez les membres de son nid. L'odeur coloniale est influencée : par l'alimentation et le milieu de vie d'une colonie mais aussi par les variations infimes mais nombreuses apportées par la naissance de nouveaux individus. L'odeur d'un individu semble être soumise au génotype de celui-ci en partie et donc chaque nouvel individu contribue à modifier l'odeur coloniale. Chez certaines espèces, en particulier les espèces dont les colonies comprennent plusieurs nids séparés (on parle de polydomie), lorsque les nouvelles ouvrières émergent de leur puppe, elles sont transportées par d'autres ouvrières matures à travers l'ensemble de la colonie pour faciliter l'acquisition passive par contact de l'odeur coloniale (Dahbi et coll. 1997).

A l'inverse, un individu qui reste isolé de sa colonie voit son profil en hydrocarbures changer en quelques jours et retrouve son odeur individuelle progressivement. Si l'isolation est courte (quelques jours), lors de son retour dans la colonie, l'individu reçoit de nombreux toilettages par les membres de sa colonie. Si l'isolation est plus longue, les membres de la colonie peuvent se comporter agressivement avec l'individu isolé et l'éjecter du nid (Boulay et coll. 2000).

Ce phénomène illustre le fonctionnement du processus de reconnaissance coloniale par lequel les ouvrières reconnaissent les membres de leur nid. Un individu est accepté s'il porte les indices coloniaux spécifiques d'un nid, dans le cas contraire, il est agressé et/ou transporté hors du nid. Chaque espèce possède un profil en hydrocarbures qui lui est propre et généralement celui-ci varie quantitativement entre les différentes colonies, c'est-à-dire que tous les individus au sein d'une espèce possèdent les mêmes hydrocarbures avec des variations de quantité entre les colonies (voir plus bas). La GPP est l'organe principal permettant à chaque individu de « mettre à jour » sa propre odeur pour que celle-ci soit en accord avec l'odeur des membres du nid. En 1995, (Vienne et coll. 1995) montrent par des expériences de traçage radioactif d'hydrocarbures que ces derniers sont transférés à la GPP et à l'ensemble de la cuticule par des trophallaxies et des toilettages entre individus.



**Figure 6.** Système de reconnaissance coloniale et son évolution selon Reeve (1989). Un individu dit « acteur » (celui qui effectue l'acte de reconnaissance) possède un seuil de reconnaissance (ligne pointillée) qui délimite l'espace des indices de reconnaissance en deux zones : une zone d'acceptation (à gauche) et une zone de rejet (à droite). En ordonnées sont représentées les fréquences des différents indices (ou ensemble d'indices) de reconnaissance en fonction de leur dissimilarité avec le *template* interne de l'individu acteur. La distribution verte regroupe les individus qui augmentent la valeur adaptative de l'acteur si celui-ci les accepte tandis que la distribution orange regroupe les individus qui diminuent la valeur adaptative de l'acteur si celui-ci les accepte. L'acceptation d'un individu dépend de la dissimilarité entre les indices de reconnaissances qu'il porte et le *template* interne de l'individu acteur et surtout du seuil de tolérance de ce dernier. Si, comme sur la présente figure, les distributions des individus désirables (en vert) et indésirables (en orange) se recoupent (c'est-à-dire que certains indices de reconnaissance sont partagés par différentes colonies) alors l'individu acteur peut faire des erreurs de reconnaissance et accepter des individus indésirables (erreur d'acceptation en gris) ou rejeter des individus désirables (erreurs de rejet en rouge). L'évolution du système de reconnaissance va alors se faire selon un compromis entre ces deux types d'erreurs en fonction du contexte général dans lequel se trouve l'individu acteur. Selon ce contexte (environnemental, ontogénique, génétique...), les pressions évolutives vont provoquer soit une spécialisation des indices de reconnaissance en fonction des colonies (1), soit une modification de l'intégration des dissimilarités entre indices et *template* interne (2) (dans les deux cas les distributions verte et orange s'éloignent l'une de l'autre), soit une plus grande restrictivité dans le seuil de tolérance de l'acteur (3) (déplacement du seuil vers la gauche). (Modifié d'après Reeve [1989] et Sherman et coll. [2007]).

Le modèle de la Gestalt implique que les individus soient en mesure de comparer l'odeur coloniale dont ils portent une représentation plus ou moins fidèle, à l'odeur d'un individu rencontré, en vue de déterminer s'il appartient à leur colonie. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène. L'hypothèse principale qui est faite est que chaque individu (chez les ouvrières majoritairement) posséderait un « modèle cognitif » (*template*) représentant l'odeur coloniale auquel est comparée l'odeur de l'individu rencontré.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer comment une ouvrière focale choisit d'accepter ou de refuser un individu au sein de sa colonie en fonction des informations chimiques portées par cet individu et du *template* interne représentant l'odeur coloniale stocké en mémoire par l'ouvrière focale. Plus la dissimilarité entre l'odeur perçue par l'ouvrière et le *template* interne qu'elle possède est grande, plus la probabilité de rejeter l'individu sera forte. Reeve (1989) propose un seuil de tolérance plastique défini à partir de cette même dissimilarité qui prend en compte les conséquences en matière de valeur adaptative du choix d'accepter ou de refuser un individu (Figure 6).

A partir de cette conceptualisation du système de reconnaissance coloniale par Reeve, deux modèles ont été adaptés : le modèle *Desirable-present* et le modèle *Undesirable-absent* qui définissent chacun un type particulier de perception des indices (Sherman et coll. 1997). Dans le modèle *Desirable-present* (= *D-present*), l'individu focal (ou acteur) se base sur la présence d'indices chimiques caractéristiques de sa colonie pour accepter ou non un autre individu : si l'individu rencontré possède ces indices, l'individu focal l'acceptera comme membre de sa colonie, dans le cas contraire, il le rejettera. Dans le modèle *Undesirable absent* (= *U-absent*), l'individu focal se base sur l'absence d'indices chimiques inconnus (ou indésirables) pour accepter ou non un autre individu : si l'individu rencontré ne possède pas ces indices inconnus, l'individu focal l'acceptera comme membre de sa colonie, dans le cas contraire, il le rejettera. Chacun de ces deux modèles définit un seuil de tolérance différent pour l'individu focal : dans le cas du modèle *D-present*, l'individu a tendance à accepter des individus à tort (i.e. accepter des étrangers) tandis que dans le cas du modèle *U-absent* l'individu focal a tendance à rejeter des individus à tort (i.e. rejeter des membres de sa colonie).

van Zweden & D'Ettorre (2010) se sont inspirés des études réalisées sur la perception d'odeur par le système périphérique chez la fourmi pour proposer un nouveau modèle de reconnaissance qui reprend les notions d'indices désirables et indésirables abordées plus haut.

Les auteurs proposent un modèle *Undesirable-present* qui régit la prise de décision d'un individu acteur d'accepter ou non un autre individu. Ce modèle est basé principalement sur deux expériences antérieures qui suggèrent que les fourmis (ou du moins les modèles étudiés) ne réagissent qu'en présence d'individus étrangers (Guerrieri et coll. 2009; Ozaki et coll. 2005). L'hypothèse qui est faite est que les individus possèdent une désensibilisation à leur odeur coloniale et ainsi ne réagissent pas lorsqu'ils perçoivent cette odeur. D'un point de vue neural, les auteurs font l'hypothèse que les individus ne possèdent pas de récepteur à l'odeur coloniale du fait d'une désensibilisation ou bien que les lobes antennaires sont habitués à cette odeur et qu'elle ne déclenche donc pas de patron d'activité des neurones dans cette zone (voir plus bas).

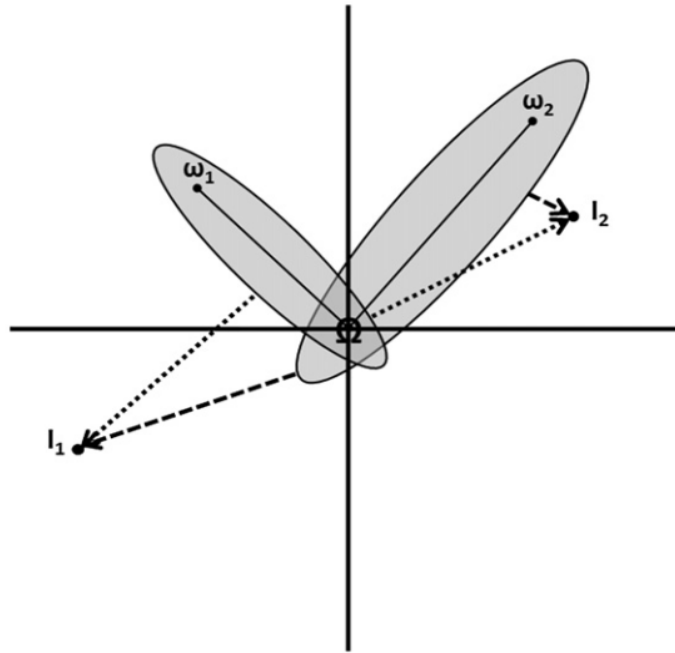
Une des caractéristiques principales de la reconnaissance chez les fourmis est qu'elle est difficile à estimer car la réponse comportementale est très variable entre les individus d'une même colonie. A la variabilité interindividuelle, s'ajoute la part de variation due au contexte, qui modifie la réponse comportementale d'un même individu en fonction de la situation dans laquelle il se trouve. Reeve (1989), dans son modèle de seuil de tolérance adaptatif, évoque cette particularité en mettant en avant le caractère nécessairement contexte-dépendant de ce seuil. Les modalités de reconnaissance sont dépendantes à la fois de l'individu, de son âge, de son expérience sociale et du contexte dans lequel il se trouve (Roulston et coll. 2003). Généralement, l'absence de réaction agonistique d'une ouvrière vis-à-vis d'un individu étranger est considérée comme l'échec du processus de reconnaissance or ce n'est pas forcément le cas (il est difficile de l'affirmer comme de l'infirmer).

Newey (2011) propose un modèle permettant d'enrichir et de dépasser cette vision d'un modèle général s'appliquant à l'identique entre les différents membres d'une même colonie. Lors de travaux antérieurs sur le système de reconnaissance coloniale de la fourmi *Oecophylla smaragdina*. Newey et coll. (2010) adoptent une approche individu-centrée plutôt que l'approche classique colonie-centrée. Cela leur permet de conclure que la variabilité dans la réponse comportementale d'individus d'une même colonie confrontés à un individu étranger constitue une caractéristique inhérente au système de reconnaissance d'*O. smaragdina* et non pas une variabilité dans la capacité de reconnaissance coloniale des individus. Les auteurs concluent de ce résultat que les individus d'une même colonie pourraient ajuster leur réponse comportementale non pas en fonction d'un « modèle cognitif » commun à la colonie (issu de la Gestalt) mais en fonction d'un « template » interne spécifique à chaque membre de la colonie. Ce modèle, développé théoriquement dans Newey



(2011) propose que ce « *template* » interne soit caractérisé par deux odeurs : l'odeur coloniale propre à l'ensemble des individus d'une même colonie et l'odeur individuelle spécifique à chaque individu. Ces deux odeurs permettent de caractériser une zone de tolérance (dans l'espace des odeurs propre à une population donnée créé par le mélange complexe de molécules cuticulaires) pour chaque individu. Tous les individus d'une même colonie partagent donc une caractéristique commune qui est l'odeur coloniale, cependant chacun des individus possèdera une zone de tolérance différente du fait de leur odeur individuelle. Tout individu, représenté dans l'espace des odeurs, se situant dans cette zone de tolérance est considéré comme un membre de la colonie tandis que s'il se situe en dehors de cette zone il sera agressé proportionnellement à la distance qui le sépare de cette zone de tolérance (Figure 7). Ce modèle permet de décrire la variabilité dans la réponse comportementale de différentes ouvrières d'une même colonie confrontées à un même intrus. Il a été testé chez *O. smaragdina* par Newey et coll. (2010) et par Sturgis & Gordon (2012a) chez *Pogonomyrmex barbatus*. Malheureusement, les résultats de ces derniers ne permettent pas de conclure clairement sur l'adéquation du modèle de Newey avec le processus de reconnaissance coloniale chez *P. barbatus*.

Un modèle similaire a été proposé par Esponda & Gordon (2015) qui prend en compte la variabilité dans la réponse des individus issus d'une même colonie. Ce modèle ressemble à celui de Newey dans le sens où les individus d'un même nid vont collectivement déterminer la réponse coloniale vis-à-vis d'un individu étranger. Dans ce modèle, chaque individu possède non pas un *template* interne mais une frontière individuelle séparant les membres du nid des non-membres du nid. Cette frontière est définie par une fonction qui accorde une valeur à chaque composante du profil chimique (dans le cas de *P. barbatus*, les auteurs proposent d'utiliser le profil en HCC) : en fonction de la série de valeurs obtenues, l'individu compare le résultat de la fonction à un seuil individuel et réagit agressivement ou non en fonction du résultat de cette comparaison. Ce mécanisme s'inspire du fonctionnement des récepteurs olfactifs du système nerveux périphérique qui reçoivent et transforment en signal électrique séparément chacune des composantes du profil chimique. Le processus par lequel la fonction décrite ci-dessus accorde des valeurs aux différentes composantes du profil chimique est dépendant de l'expérience de vie de chaque individu : ses rencontres avec des membres et non-membres de sa colonie et les interactions avec eux.



**Figure 7.** Représentation théorique du *template* sous forme d'un vecteur. L'espace représenté dépeint une réduction en deux dimensions de l'espace olfactif généré par le bouquet d'odeurs spécifique à l'espèce (*Oecophylla smaragdina*).  $\Omega$  représente l'odeur coloniale partagée par les individus  $A_1$  et  $A_2$  tandis que  $\omega_1$  et  $\omega_2$  représentent leurs odeurs « innées » respectives. Les deux ellipsoïdes qui entourent les vecteurs  $\overrightarrow{\Omega\omega_1}$  et  $\overrightarrow{\Omega\omega_2}$  représentent les zones de tolérance des individus  $A_1$  et  $A_2$ : si l'odeur d'un congénère se situe dans la zone de tolérance de l'individu  $A_i$ , alors il sera traité comme un individu appartenant à la même colonie par l'individu  $A_i$ .  $I_1$  et  $I_2$  représentent deux individus appartenant à une colonie différente au sein de la même population. Le niveau d'agression exprimé par un individu  $A_i$  à l'encontre d'un étranger est proportionnel au segment pointillé partant de la surface de l'ellipse propre à l'individu  $A_i$  et se terminant au niveau de la position de l'individu étranger dans l'espace des odeurs. (D'après Newey [2011]).

L'ensemble des intersections formées par les frontières individuelles des membres d'une même colonie définit la réaction à l'échelle coloniale à un individu étranger donné. Ainsi, l'ensemble des réponses individuelles permet d'obtenir une réponse collective à l'échelle du nid.

Un avantage de ce type de modèle soulevé par les auteurs est qu'il ne nécessite pas de définir l'odeur coloniale d'un nid qui représente une notion ambiguë. Ce modèle permet de décrire le système de reconnaissance chez *P. barbatus*, en revanche, comme le soulignent les auteurs, sa validité en tant que mécanisme général ne pourra être validée qu'en testant son application à différentes espèces. La difficulté de trouver un modèle de reconnaissance qui soit applicable

à une majorité d'espèces semble une tâche difficile du fait des variations entre colonies, entre populations et entre espèces mais aussi à cause des variations dans l'agressivité liées au contexte (Roulston et coll. 2003; Sturgis & Gordon 2012a).

Les deux principales questions que soulève la notion de « modèle cognitif » sont : d'une part, la nature d'un tel modèle et d'autre part où est stockée cette information dans le système nerveux d'une fourmi. La neurophysiologie permet d'apporter des pistes de réponse à de telles questions.

### II.C.2. Bases neurophysiologiques de la reconnaissance coloniale

En 2005, une étude d'Ozaki et coll. propose que la reconnaissance coloniale s'effectue au niveau du système nerveux périphérique et que la discrimination entre membres et non-membres de la colonie s'effectue directement au niveau des sensilles de l'antenne. L'équipe japonaise enregistre chez des ouvrières de *Camponotus japonicus*, les potentiels d'actions/de champs au niveau d'une sensille et montrent que celle-ci n'émet aucune réponse à la présentation du profil en HCC provenant d'individus homocoloniaux mais répond à la présentation du profil en HCC d'individus hétérocoloniaux. Les auteurs concluent que cette sensille pourrait être impliquée dans la discrimination entre membres et non-membres de la colonie par un individu.

En 2011, Brandstaetter et coll. tentent de confirmer ce résultat en observant le schéma d'activation des neurones du lobe antennaire lors de la présentation de profils en HCC de membres et non-membres de la colonie chez des ouvrières de *Camponotus floridanus*. Ils trouvent que les deux types de profils entraînent des schémas d'activité neuronale dans le lobe antennaire, ce qui prouve que les HCC homocoloniaux déclenchent bien une réponse et que les ouvrières ne sont pas anosmiques à l'odeur de leur propre colonie. En revanche, les auteurs montrent qu'il est impossible de discriminer spatialement les patrons d'activité neuronaux entre ceux évoqués par des HCC homocoloniaux et ceux évoqués par des HCC hétérocoloniaux. Ils suggèrent que la discrimination pourrait provenir de patrons temporels subtils ou d'un autre type de codage non mis en évidence dans leur étude.

Une étude de Leonhardt et coll. (2007) a considérablement amélioré notre compréhension de la formation du « modèle cognitif » représentatif de l'odeur colonial. Les auteurs ont appliqué sur les antennes d'ouvrières de *C. floridanus*, des extraits de GPP homo- ou hétérocoloniaux qu'ils ont laissé incuber dans un groupe 2 heures et dans un autre groupe 15 heures avant de réaliser des rencontres avec des individus homo- ou hétérocoloniaux. L'objectif était de

déterminer le laps de temps nécessaire aux individus manipulés pour altérer leur agressivité basale dirigée envers les ouvrières hétérocoloniales de manière à savoir en combien de temps se reformait le « modèle cognitif interne ». Leurs expériences montrent que l'agressivité des individus manipulés est inchangée par rapport à celle des contrôles (individus non manipulés) mais après 15 heures d'incubation, l'agressivité envers les individus hétérocoloniaux diminue et celle envers les individus homocoloniaux reste inchangée (faible). Ces résultats suggèrent que la reconfiguration du « modèle cognitif » est un processus lent et donc les auteurs en concluent que ce processus doit faire intervenir les centres nerveux supérieurs plutôt que les récepteurs olfactifs du système nerveux périphérique.

## **II.D. Informations sur statuts reproducteur et de fertilité**

Mise à part la reconnaissance coloniale, qui permet aux colonies de conserver leur intégrité vis-à-vis d'intrus, une autre information primordiale permet le maintien des sociétés d'insectes : celle relative à la présence de la caste reproductrice. Il est nécessaire pour chaque individu de savoir déterminer qui se reproduit au sein de sa colonie. Cela est d'autant plus vrai pour les espèces chez lesquelles la caste ouvrière à conserver la capacité à pondre des œufs et même parfois celle de copuler avec des mâles (une synthèse de ce phénomène est disponible dans Peeters [1991]). Les principales questions qui restent relativement ouvertes à l'heure actuelle sont de savoir si les reines produisent des signaux pour indiquer leur présence et leur fertilité aux ouvrières et si ces signaux sont honnêtes (i.e. s'ils reflètent le véritable état de fertilité de la reine) ou s'ils ont pour objectif de manipuler les ouvrières pour augmenter la valeur adaptative de la reine. Une dernière question est également de savoir si ces signaux sont conservés chez les Formicidés ou même chez les Hyménoptères eusociaux en général.

### **II.D.1. Fertilité, agressivité et hydrocarbures cuticulaires**

#### *II.D.1.1 La reproduction chez les ouvrières et le comportement de policing*

Chez les hyménoptères, le développement ovarien est lié à des changements plus ou moins importants du profil en HCC. Ce phénomène a été montré chez les fourmis (Liebig 2010; Monnin 2006), les guêpes polistes (Izzo et coll. 2010) et les abeilles (Mélipones : Nunes et coll. [2010]). Chez les fourmis, on constate une importante diversité dans le type d'individus assurant la reproduction. Certaines espèces ayant conservé des caractéristiques ancestrales,

les ouvrières sont toutes capables de s'accoupler et de pondre des œufs viables tandis que dans d'autres taxons, les ouvrières ont perdu la possibilité de pondre (même des œufs non fécondés) au profit de reines dont la productivité est extrêmement élevée.

Chez les Ponérines, les ouvrières ont conservé la capacité de se reproduire et même, parfois, de copuler avec un mâle (Peeters 1991). Parmi cette sous-famille, on trouve des espèces sans reine (i.e. qu'il n'y a pas d'individu reproducteur morphologiquement spécialisé), la femelle reproductrice étant alors une des ouvrières de la colonie qui a réussi à monopoliser la reproduction à l'issue de combats ritualisés engageant tout ou partie des individus du nid. Chez ces espèces, les conflits intra-coloniaux sont importants du fait que chaque ouvrière peut potentiellement assurer la production de mâles et de femelles si elle se reproduit.

La dynamique du changement du profil en HCC en lien avec l'acquisition du statut reproducteur a été abondamment étudiée chez ces espèces, ainsi que le lien entre l'agressivité et le développement ovarien des ouvrières. Par exemple, chez *Dinoponera quadriceps*, l'acquisition du statut reproducteur s'accompagne d'une augmentation significative (doublement) de la quantité relative de 9-hentriacontène (9-MeC<sub>31:1</sub>) (Peeters et coll. 1999). Cet alcane ramifié est l'un des composés les plus représentés sur la cuticule des individus fertiles tandis qu'il est quasi-inexistant chez les individus non fertiles. Chez cette espèce, les ouvrières forment une hiérarchie de dominance quasi-linéaire où seul l'individu de plus haut rang (appelé l'alpha) produit la majorité du couvain. En plus de l'alpha, d'autres individus de haut rang peuvent espérer accéder à la reproduction lorsque l'alpha meurt. Généralement, l'individu qui devient l'alpha dans la hiérarchie est l'individu beta (juste en dessous dans la hiérarchie). A la mort de l'ancien alpha, l'individu beta devient extrêmement agressif envers toutes les autres ouvrières et commence à acquérir un profil en hydrocarbures cuticulaires caractéristique des individus reproducteurs. Les individus alpha possèdent une concentration importante en 9-MeC<sub>31:1</sub>, qu'ils se soient reproduits ou non, ce qui suggère que ce composé pourrait signaler le statut de fertilité plutôt que celui d'appariement. D'autre part, les alphas pondent plus que les autres ouvrières de haut rang et cannibalisent les œufs pondus par ces dernières de manière quasi-systématique (Monnin & Peeters 1997).

Chez la fourmi *Diacamma ceylonense* (Ponérine), une autre espèce de fourmi sans reine, la fonction reproductrice est déterminée par la présence de deux appendices thoraciques, appelés les « gemmae ». Seul l'individu alpha conserve ces appendices et mutile l'ensemble des ouvrières à leur naissance en leur coupant les gemmae. L'ablation des gemmae entraîne chez ces ouvrières l'impossibilité de s'accoupler avec un mâle et donc l'impossibilité de

produire des œufs diploïdes. L'ouvrière qui se reproduit avec un mâle (on parle de *gamergate*) et assure la reproduction du nid possède une signature chimique qui diffère de celle des ouvrières qui ne pondent pas. Cette signature chimique n'est pas due à la présence des gemmae mais les auteurs ne précisent pas si le statut d'insémination de l'individu a une influence sur la chimie cuticulaire (cependant, consulter Cuvillier-hot et coll. [2002]). Les ouvrières qui pondent des œufs non fertilisés possèdent un profil intermédiaire entre le *gamergate* et les ouvrières stériles (qui ne pondent pas). Parmi les composés qui diffèrent entre les individus fertiles et non fertiles on trouve différents mono-méthyles (méthylpentacosane, méthylheptacosane) et un *n*-alcane (le nonacosane) (Cuvillier-Hot et coll. 2001). La seule phase d'agression chez *Diacamma ceylonense* constitue la période durant laquelle un *gamergate* meurt. A ce moment, la première ouvrière qui éclot de son cocon, du fait qu'elle conserve ses gemmae, devient le nouveau *gamergate* (Cuvillier-hot et coll. 2002). On observe une corrélation entre le développement ovarien de ce nouvel individu reproducteur et la diminution progressive de son agressivité. Les auteurs suggèrent que la division du travail reproductif est sous-tendue à un stade précoce par l'agressivité des ouvrières de haut rang qui entrent en compétition pour obtenir le statut de reproducteur unique du nid. Une fois qu'un individu est parvenu à obtenir ce statut, le développement de ses ovaires modifie sa signature chimique qui indique alors le statut d'individu reproducteur. A ce stade, l'agressivité décroît et la division du travail repose ensuite sur le signalement chimique de la présence d'un *gamergate*.

La dynamique de l'agressivité durant la phase de remplacement d'un reproducteur a également été étudiée chez la fourmi *Gnamptogenys striatula* (Ponérine), une autre espèce chez laquelle la présence d'une ou plusieurs reines (au sens morphologique) est facultative et où la reproduction est généralement assurée par un ou plusieurs *gamergates* (ouvrières qui se sont accouplées avec des mâles) (Blatrix & Jaisson 2000). Chez *G. striatula*, la phase d'agressivité et les comportements de dominance lors du remplacement du ou des individus reproducteurs est très limitée et n'apparaît que lorsque deux ouvrières de haut rang possèdent une fertilité équivalente (Lommelen et coll. 2010). Les auteurs de cette étude constatent que 4 diméthylalcane (les 3,13- et 3,15-diméthylpenta/hepta-triacontane) et un triméthylalcane (3,11,15-triméthylheptatriacontane) sont présents uniquement chez les individus fertiles et corrélient avec l'activité de ponte actuelle de l'individu. De plus, leurs résultats montrent que ces composés ne permettent pas de déterminer le statut d'appariement, comme c'est certainement le cas aussi chez *Diacamma ceylonense* (Cuvillier-hot et coll. [2002], page

1298, §4 et §5). Le signal de fertilité serait donc un indicateur de la productivité réelle d'un *gamergate* ce qui représente une information vitale pour que les individus stériles du nid retiennent leur propre reproduction.

On trouve de même une organisation en hiérarchie linéaire d'ouvrières chez la fourmi *Streblognatus petersi* (Cuvillier-Hot et coll. 2004; Cuvillier-Hot et coll. 2005). Les individus reproducteurs possèdent une signature chimique différente de celle des individus qui ne pondent pas. D'autre part, le développement d'une signature atypique indiquant le statut reproducteur est détectable dès 48 heures après l'acquisition de la fonction de *gamergate* chez *S. petersi*. En effet, lorsque l'on isole l'individu alpha de la colonie, les individus de haut rang s'engagent dans des interactions agonistiques pour obtenir la position d'alpha et généralement l'individu beta obtient cette position (Cuvillier-Hot et coll. 2004). Si l'ancien individu alpha est replacé dans sa colonie, selon le temps qu'il a passé en isolation, le nouvel alpha (i.e. l'ancien beta) aura eu le temps d'acquérir la signature chimique caractéristique d'un individu reproducteur (i.e. environ 48 heures d'isolation de l'ancien alpha). Si c'est le cas, le nouvel alpha est attaqué par l'ancien alpha de retour qui reconnaît une signature d'individu fertile et donc de reproducteur. Si le nouvel alpha n'a pas eu le temps de développer cette signature chimique caractéristique de *gamergate*, alors l'ancien alpha ne l'attaque pas mais les ouvrières du nid (non fertiles) immobilisent le nouvel alpha ce qui a pour conséquence de bloquer son développement ovarien. Si le nouvel alpha a développé une signature de *gamergate*, dans la plupart des cas, les ouvrières immobilisent l'ancien alpha. Ce résultat suggère que les ouvrières sont capables de reconnaître précisément le niveau de fertilité d'un individu et sont en charge du maintien de la monogynie, c'est-à-dire qu'elles s'empêchent mutuellement de se reproduire lorsqu'un *gamergate* est présent dans le nid. Ce phénomène (contrôle mutuel de la reproduction par les ouvrières) est répandu chez les fourmis et est appelé comportement de *policing*.

Le *policing* est défini par deux comportements distincts non exclusifs : les ouvrières exerçant le *policing* peuvent soit cannibaliser les œufs pondus par une ouvrière en présence d'un individu reproducteur et/ou elles peuvent agresser physiquement cette ouvrière (souvent une immobilisation pouvant durer jusqu'à plusieurs heures). L'occurrence de ce comportement peut s'expliquer par la structure génétique de la colonie (théorie de la *kin selection*) ou bien par le coût associé à la présence d'un trop grand nombre d'individus reproducteurs au sein du nid (du fait qu'un individu reproducteur n'accomplit généralement aucune autre tâche que la production de couvain). Si une grande majorité d'ouvrières se reproduisent au sein d'une

même colonie, alors cela a pour effet de réduire la fraction d'individus alloués au soin du couvain et d'entraîner simultanément une augmentation de la quantité de couvain dont il faut assurer l'élevage (Wilson 1974).

En fonction de la structure génétique de la colonie et selon la théorie de la *kin selection*, on peut prédire que les ouvrières devraient favoriser le maintien de leur mère plutôt que celui d'une de leurs sœurs comme reproducteur de la colonie. En effet, sous l'hypothèse d'une colonie monogyne monoandre (ce qui semble être les cas chez plusieurs espèces de fourmis sans reine) tandis qu'une mère produit, du point de vue d'une ouvrière focale, principalement des sœurs ( $r = \text{coefficient de parenté moyen} = 0.75$ ), une sœur produit (toujours du point de vue d'une ouvrière focale) des nièces uniquement ( $r = 0.25$ )<sup>§</sup>.

Chez la fourmi *Harpegnathos saltator* (Ponérine), la présence de la reine (seul individu ailé) est nécessaire uniquement lors de la phase de fondation car les ouvrières, qui peuvent se reproduire, ne sont pas capables de fonder une nouvelle colonie. Lorsque la reine meurt, elle est remplacée par des *gamergates* qui possèdent une activité de ponte de moitié inférieure à celle de la reine (Peeters et coll. 2000) (voir Figure 9). Si des ouvrières sont séparées des individus reproducteurs de leur colonie, elles se mettent à développer leurs ovaires et leur profil en hydrocarbures cuticulaires change pour approcher celui caractéristique des individus possédant une activité de ponte. La signature chimique des individus qui pondent est reconnaissable du fait d'une augmentation des HCC à longue chaîne (> 31 carbones) et de la présence de 13,23-diméthylheptatriacontane (13,23-diMeC<sub>37</sub>), absent chez les individus ne pondant pas (Liebig et coll. 2000). Il est important de noter que les reines qui ne pondent pas ont un profil similaire à celui des ouvrières (Liebig et coll. 2000). Lorsqu'un individu ayant initié une activité reproductrice est replacé dans sa colonie, il est rapidement attaqué par les ouvrières qui expriment un comportement typique de *policing* qui consiste à sauter sur la victime et la saisir entre ses mandibules (parfois plusieurs heures) (Liebig et coll. 2000). Ce comportement déclenche un arrêt du développement ovarien chez l'individu policé qui régresse vers un état stérile. Le profil en HCC se modifie alors à nouveau pour retranscrire le nouvel état de stérilité (la modification se fait en quelques semaines) (Liebig et coll. 1999). Dreier et coll. (2007) ont montré qu'il existe une spécialisation des ouvrières dans le comportement de *policing* chez *Neoponera inversa*. Au sein du genre *Neoponera*, les ouvrières ne possèdent pas de spermathèque (organe de stockage du sperme) et de ce fait ne peuvent se reproduire. Cependant elles pondent des œufs non fertilisés et établissent des

<sup>§</sup> Encore une fois, il n'est pas fait état de la production de mâles qui modifie les résultats reportés ici.



hiérarchies de dominance dont les individus de plus haut rang sont généralement les plus fertiles. En présence de la reine, les ouvrières ne se reproduisent généralement pas mais certains individus peuvent occasionnellement développer leurs ovaires et pondre des mâles. Dès lors que les changements liés à l'activité reproductive sont perçus par les autres ouvrières, ces individus sont alors policés et leurs œufs sont détruits. D'Ettoire et coll. (2004) ont montré chez *N. inversa* que les œufs pondus par une ouvrière diffèrent de ceux pondus par la reine et peuvent être détectés par les ouvrières effectuant le *policing* via des hydrocarbures cuticulaires différents. D'autre part, Dreier et coll. (2007) ont eux mis en évidence chez la même espèce qu'il existe une spécialisation des ouvrières dans la tâche de *policing* et que tous les individus stériles de la colonie n'y participent pas équitablement. De même, les auteurs montrent que les ouvrières spécialisées dans le *policing* n'ont jamais d'ovaires développés ce qui implique que cet acte ne constitue pas un comportement égoïste visant à garantir le monopole de la reproduction par l'ouvrière qui l'effectue.

Il est important de noter que le comportement de *policing* n'est pas restreint aux espèces basales d'un point de vue phylogénétique. En effet, ce comportement s'exprime chez toutes les espèces chez lesquelles les ouvrières ont conservé la capacité de pondre (des œufs non fertilisés pour la plupart).

Par exemple, le comportement de *policing* a été étudié chez les fourmis du genre *Formica*, considérées comme hautement eusociales. Helanterä & Sundström (2007b) ont montré que la proportion d'œufs produit par des ouvrières au sein de ce groupe est importante ce qui justifie la présence de mécanismes de restriction de la reproduction chez ces ouvrières. Parmi 9 espèces étudiées, les ouvrières de 7 espèces produisent des œufs viables (i.e. se développant en larves) au laboratoire, en présence ou en absence de reine. Parmi les échantillons collectés au sein de colonies sur le terrain, chez 5 espèces parmi les 7 étudiées, une proportion non négligeable d'œufs (de 0.5 à 27% des œufs collectés) s'est révélée être issue d'ouvrières.

Par ailleurs, dans une étude précédente (Helanterä & Sundström, 2007a), les mêmes auteurs montrent que le comportement de *policing* chez *Formica fusca* (une des espèces étudiée dans Helanterä & Sundström [2007b]) consiste à cannibaliser les œufs produits par d'autres ouvrières du même nid. Chez *F. fusca*, les individus développant leurs ovaires en présence d'une reine ne sont que très rarement attaqués par les autres ouvrières du nid.

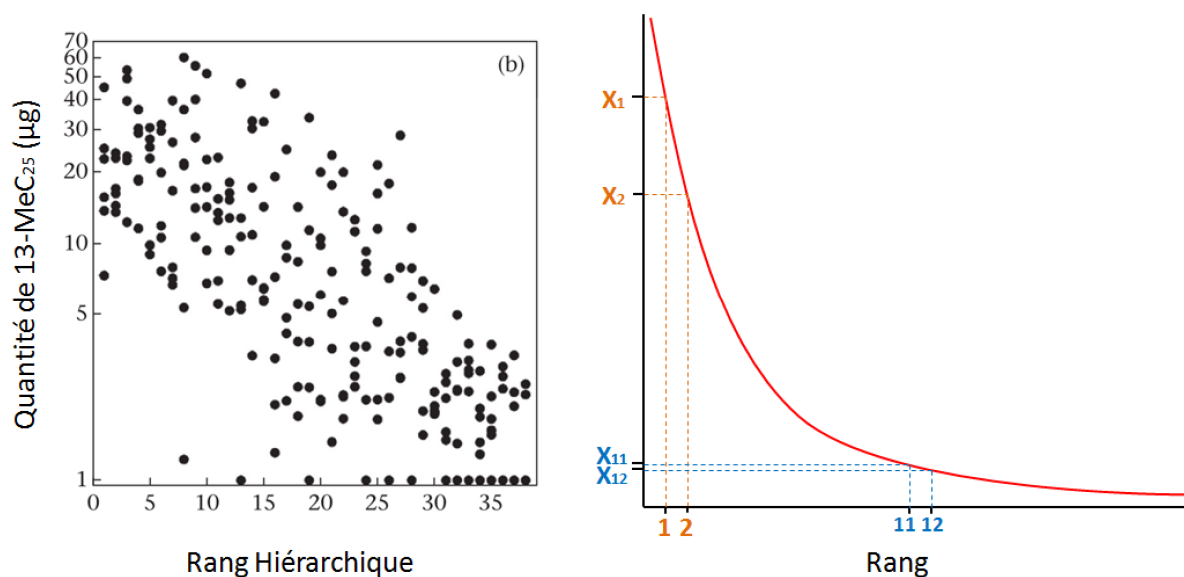
Chez *Aphaenogaster cockerelli*, une espèce de la sous-famille des Myrmicines, les ouvrières ont un fort potentiel reproducteur et se mettent à pondre après deux semaines passées en isolement de leur reine (Smith et coll. 2008). Contrairement aux *Formica*, les ouvrières d'A.

*cockerelli* ne sont pas capables de discriminer les œufs pondus par la reine de ceux pondus par des ouvrières car le profil en hydrocarbures cuticulaires est très similaire pour ces deux catégories d'œufs (Smith et coll. 2008). En revanche, les ouvrières qui produisent des œufs (i.e. les ouvrières reproductives) possèdent un profil en hydrocarbures intermédiaire entre celui des ouvrières stériles et celui des reines très fertiles. Les ouvrières reproductives sont ainsi reconnues et agressées par les individus pratiquant le *policing* (Smith et coll. 2008, 2009 et 2011). En particulier, les ouvrières reproductives diffèrent dans leur profil en hydrocarbures par la présence de pentacosane (C25), composé caractéristique des individus fertiles, qui est strictement absent chez les ouvrières stériles (Smith et coll. 2008; Smith et coll. 2009). Smith et coll. (2009) appliquent ce composé de manière topique sur des ouvrières stériles qu'ils replacent ensuite dans leur colonie d'origine en présence de la reine. Ils observent que les ouvrières au profil manipulé reçoivent la même quantité d'agression que des ouvrières reproductives. Ce résultat montre que les ouvrières pratiquant le *policing* utilisent les hydrocarbures cuticulaires pour reconnaître les individus qui se reproduisent au sein de la colonie et qu'un composé cuticulaire caractéristique de l'état de fertilité est suffisant pour déclencher ce comportement.

Enfin, de récents travaux sur la discrimination des rangs au sein de hiérarchies reproductives chez des ouvrières de *Neoponera apicalis* suggèrent fortement que les ouvrières puissent utiliser également la quantité de certains hydrocarbures comme un signal fiable du rang social et du développement ovarien d'un individu (Yagound et coll. 2014). Les auteurs de ces travaux montrent en effet que les ouvrières de haut rang sont capables de discriminer d'autres ouvrières de haut rang aux positions consécutives dans la hiérarchie (i.e. séparées d'un rang social) mais qu'elles sont incapables de discriminer entre deux ouvrières séparées d'un unique rang appartenant au bas de la hiérarchie. De plus, l'étude montre que la relation entre les quantités de 3-méthylpentacosane (3-MeC25), hautement corrélées au développement ovarien chez *N. apicalis*, et les rangs des individus est de distribution exponentielle, ce qui pourrait expliquer la capacité des ouvrières de haut rang à pouvoir discriminer entre deux individus de haut rang mais pas entre deux individus de bas rang (Figure 8).

Un autre résultat intéressant de cette étude est le fait que des ouvrières de bas rang ne sont pas capables de discriminer de manière fine deux ouvrières espacées d'un rang appartenant au sommet de la hiérarchie. Sachant que l'effet de la motivation était contrôlé durant les expériences, les auteurs en concluent que les ouvrières de bas rang pourraient ne pas posséder les capacités de discrimination des individus de haut rang. Une hypothèse avancée par

Yagound et coll. (2014) est que l'obtention d'un haut rang et les modifications physiologiques qui s'ensuivent pourraient entrainer un développement cognitif spécifique chez les individus dominants leur permettant de réduire les coûts associés aux agressions en discriminant avec précision le rang d'autres individus dominants. Les auteurs proposent que ces capacités cognitives se développent sous l'influence de neuro-modulateurs dont les taux sont dépendants de l'état physiologique (dans le cas présent, l'état de fertilité).



**Figure 8.** Relation entre la quantité de 13-méthylpentacosane et le rang hiérarchique chez des ouvrières de *Neoponera apicalis*. **A gauche** : relation  $\log(13\text{-MeC}_{25})$  – rang hiérarchique. **A droite** : relation 13-MeC<sub>25</sub> – rang hiérarchique. Deux individus de haut rang (rangs 1 et 2) ont des quantités de 13-MeC<sub>25</sub> très différentes ( $X_1$  et  $X_2$ ) alors qu'ils sont espacés d'un unique rang tandis que deux ouvrières ayant deux bas rangs consécutifs (rangs 11 et 12) auront des concentrations en 13-MeC<sub>25</sub> très proches ( $X_{11}$  et  $X_{12}$ ). (D'après Yagound et coll. [2014]).

### *II.D.1.2 Amines biogènes, hormone juvénile et ecdystéroïdes : lien avec l'agressivité et la fertilité*

La diminution du développement ovarien ainsi que la perte du rang social des ouvrières qui subissent du *policing* de la part d'autres ouvrières indiquent qu'il existe un lien entre l'environnement social perçu par le système nerveux central des individus et leur physiologie reproductive. De nombreuses études se sont donc intéressées aux hormones et neuro-modulateurs qui pourraient potentiellement établir ce lien entre environnement social et physiologie reproductive.

Une hormone qui a été particulièrement bien étudiée est l'hormone juvénile (JH pour *Juvenile Hormone*), qui est un composé pléiotropique impliqué dans la régulation de la physiologie et l'ontogénie chez les insectes (Hartfelder 2000). La JH est synthétisée principalement au niveau des *corpora allata*, organes situés dans la capsule céphalique ventralement par rapport au ganglion sous-œsophagien.

Chez les insectes solitaires, ainsi que chez les Hyménoptères dont l'eusocialité existe sous sa forme la plus primitive (guêpes et bourdons), la JH stimule la production et l'utilisation de la vitellogénine (un précurseur du vitellus nécessaire au développement de l'œuf).

Cependant, chez de nombreux Hyménoptères hautement sociaux, il semblerait que cet effet de la JH ait disparu (Hartfelder 2000). Chez les fourmis sans reine, on constate une plus grande quantité de JH circulant dans l'hémolymphe chez les fourrageuses et chez les individus subordonnés que chez les ouvrières dominantes, les *gamergates* et les reines (*Diacamma ceylonense* : Sommer et coll. [1993], *Streblognathus peetersi* : Brent et coll. [2006], *Harpegnathos saltator* : Penick et coll. [2011]). De plus, Cuvillier-Hot et coll. (2004) montrent que l'application topique d'un analogue de la JH (le Pyriproxifène) réduit la fertilité de la reine chez *S. peetersi*.

Cependant, cette tendance ne semble pas être généralisable car chez la fourmi *Solenopsis invicta*, le taux de JH est corrélé à la fertilité des reines (Brent & Vargo 2003). Pour expliquer la perte de l'effet stimulateur de la JH sur la reproduction chez les espèces de fourmis sans reine, Brent et coll. (2006) proposent que chez ces espèces les individus nécessitent un mécanisme alternatif à la JH pour permettre un contrôle de l'activité de reproduction pouvant être assurée par n'importe quelle ouvrière. Ainsi, d'après les auteurs, la JH ne serait donc impliquée dans l'activité de reproduction uniquement chez les reines vraies et permettrait de réguler le polyéthisme d'âge chez les ouvrières comme cela a été mis en évidence chez *Apis mellifera* (Hartfelder 2000; Robinson 1987).

Penick et coll. (2011) testent cette hypothèse chez *H. saltator* en étudiant l'effet de la JH sur la reproduction chez des reines et des ouvrières reproductives (*gamergates*) et montrent que chez les deux castes, cette hormone a perdu son effet sur la physiologie reproductive. En revanche, l'étude révèle un effet de la JH sur le comportement adopté par les ouvrières et leur spécialisation en nourricières ou fourrageuses. Pour expliquer la conservation de l'effet gonadotrope de la JH chez les reines de *Solenopsis invicta* mise en évidence par Brent & Vargo (2003), Penick et coll. (2011) proposent que ce caractère soit réapparu chez *S. invicta* du fait de la stérilité des ouvrières entraînant une séparation des effets de la JH sur la caste

ouvrière et sur la caste des reines. Les reines de *S. invicta* étant fortement fertiles (i.e. qu'elles pondent bien plus d'œufs que les reines ou *gamergates* chez les Ponérines [plusieurs centaines par jour contre moins de 10 œufs par jour respectivement]) elles pourraient avoir ré-évolué la fonction initiale gonadotrope de la JH sans que cela n'affecte les ouvrières stériles chez lesquelles cette hormone serait impliquée dans la division des tâches. A contrario, chez les ouvrières d'espèces de Ponérines (e.g. *D. ceylonense*, *H. saltator* ou *S. peetersi*), la JH aurait perdu sa fonction gonadotrope au bénéfice d'un effet uniquement sur la division des tâches (non reproductives) comme chez la plupart des insectes eusociaux à la socialité développée (voir la discussion de Penick et coll. [2011]).

Autre élément important permettant de réguler l'activité neurale et d'influer sur les capacités cognitives : les amines biogènes. Les principales amines biogènes chez les arthropodes sont l'octopamine, la dopamine et la sérotonine. Ces composés, très présents dans le système nerveux chez les insectes, sont des candidats idéals pour connecter le système nerveux central, le comportement et la physiologie. Une récente revue fait l'état des différents rôles joués par ces composés dans l'organisation de la vie sociale des insectes (Kamhi & Traniello 2013). Deux récentes études réalisées chez *H. saltator* et *Diacamma* sp. suggèrent un rôle possible de la dopamine dans la régulation de l'activité chez ces espèces (Okada et coll. 2015; Penick et coll. 2014). Okada et coll. (2015) montrent qu'une application topique de dopamine sur les ouvrières de *Diacamma* subordonnées entraîne une croissance des oocytes chez ces dernières mais pas l'apparition de comportements agressifs. De plus ces auteurs mettent en évidence la présence de récepteurs à la dopamine au niveau des corps gras abdominaux, indiquant que l'activité de ces organes (impliquée dans la synthèse des hydrocarbures cuticulaires et dans la physiologie de la reproduction) est très certainement sous contrôle de la dopamine. Okada et coll. (2015) proposent que le niveau de dopamine présent dans le cerveau d'un individu dominant soit la conséquence des comportements agonistiques permettant l'obtention de sa position sociale et qu'il constitue l'élément déclencheur du développement ovarien.

## II.D.2. Les phéromones de reines

### II.D.2.1 Différences du profil en HCC entre reines vraies et ouvrières

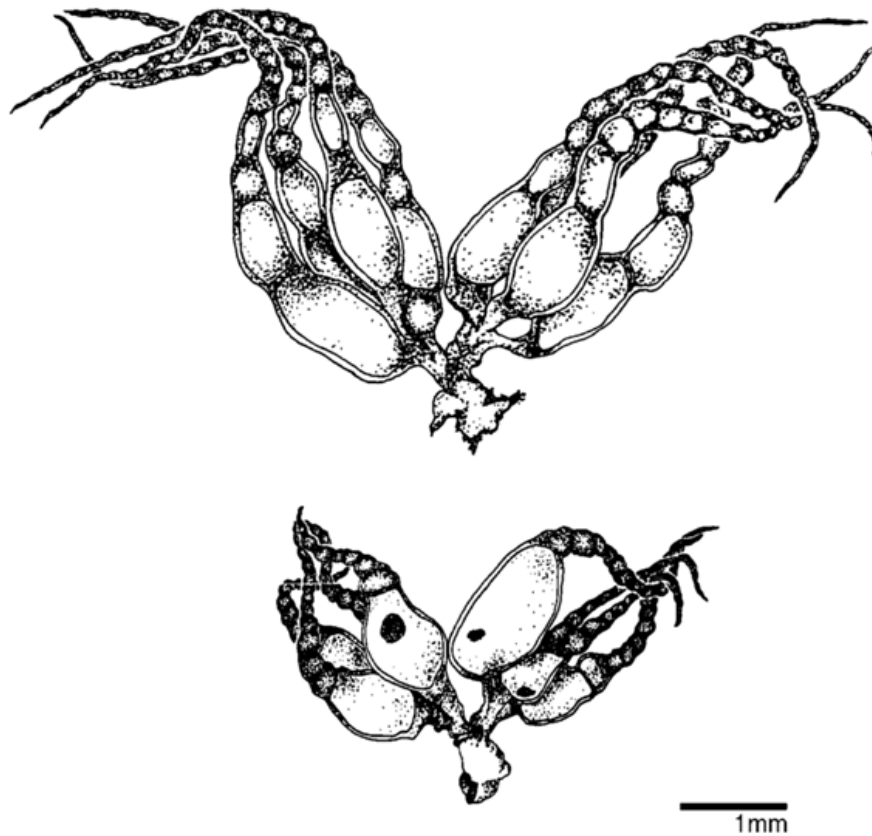
Il est tout de même intéressant de noter que les ouvrières qui parviennent à se reproduire n'atteignent généralement jamais la fertilité d'une reine (Peeters 1993; Peeters et coll 2000)

(voir Figure 9). Cela se reflète dans le nombre d'ovarioles que possèdent les reines qui est souvent supérieur à celui observé chez les ouvrières (Ponérines : Peeters [1993]; autres sous-familles : Villet [1990]). Les ovarioles sont les structures de l'appareil génital au sein desquelles s'opère la maturation des oocytes, un grand nombre d'ovarioles indique donc un fort potentiel reproducteur.

Les variations du profil en HCC entre reines et ouvrières ont été mises en évidence chez plusieurs espèces appartenant à différentes sous-familles. Ces changements sont qualitatifs (composés différents entre les deux castes) et/ou quantitatifs (proportions différentes) et peuvent être minimes ou bien extrêmement importants. Le profil en HCC tend à se complexifier chez les individus reproducteurs. On observe chez plusieurs espèces, l'apparition de bouquets de composés aux chaînes carbonées plus longues ou plus courtes selon les cas et il semblerait également que les composés insaturés soient plus fréquents chez les individus reproducteurs.

De manière générale, on observe une tendance pour toutes les espèces étudiées : la complexification du profil des reines par rapport à celui des ouvrières est dépendante de la différence de potentiel reproducteur entre ces deux castes. Pour les espèces chez lesquelles les ouvrières ont un fort potentiel de reproduction (fourmis sans reine, *A. cockerelli*), les différences de chimie cuticulaire sont peu marquées, à l'opposé, chez les espèces avec des reines extrêmement productives et des ouvrières stériles, ces différences sont majeures. Cela suggère que les HCC reflètent bien l'état de fertilité des individus et que leur production est inextricablement contrainte par la physiologie reproductive des individus.

De nombreuses études se sont attaché à mettre en évidence les différences du profil en hydrocarbures entre reines et ouvrières chez les fourmis (pour une synthèse voir (Van Oystaeyen et coll. 2014)). Parmi ces études, la plupart mettent en évidence des différences significatives dans la concentration de certains HCC entre les deux castes ou bien révèlent la présence de composés spécifiques d'une ou de l'autre caste. Seule une petite partie de ces travaux a précisément étudié la corrélation entre le développement ovarien des reines et la quantité de chaque composé cuticulaire.



**Figure 9.** Différence entre les ovaires d'une reine active (haut) et d'un *gamergate* (ouvrière reproductrice) (bas) chez *Harpegnathos saltator*. Chaque ovaire est composé de quatre ovarioles, celles des reines sont plus longues et contiennent plus d'ovocytes contenant du vitellus (donc proche de la maturité). Les reines possèdent des ovarioles plus allongées et celles-ci contiennent plus d'ovocytes que chez les *gamergates*. (D'après Peeters et coll. [2000], dessin à partir d'une photographie).

Les différences du profil en HCC entre reines et ouvrières peuvent être extrêmement importantes comme chez les fourmis *Camponotus floridanus* (Endler et coll. 2004) et *Linepithema humile* (De Biseau et coll. 2004) où environ 50% du profil diffère entre les reines matures et les ouvrières et reines non mature. Chez ces deux espèces, les reines matures sont très fertiles et pondent plusieurs dizaines d'œufs par jour, ce qui explique des changements considérables de leur profil en HCC. Lors de la maturation, les jeunes reines acquièrent lentement le profil caractéristique d'individus hautement fertiles en même temps qu'elles voient leur taux de ponte augmenter tout aussi progressivement.

A l'opposé, ces différences peuvent être relativement faibles comme chez la fourmi *Aphaenogaster cockerelli* chez qui le profil en HCC d'une reine est fortement similaire à celui d'une ouvrière reproductrice (Smith et coll. 2008).

Si chez certaines espèces, les reines vierges ou peu fertiles possèdent un profil cuticulaire similaire à celui des ouvrières non fertiles (par exemple chez *C. floridanus*, voir (Moore & Liebig [2010]), chez d'autres espèces cela n'est pas le cas (Eliyahu et coll. [2011], chapitre 2). Le profil cuticulaire peut encoder différentes informations ayant trait à l'histoire de vie des reines comme par exemple la fécondation (Hora et coll. 2008) ou encore le signalement de la caste reproductrice. Ces différentes informations s'ajoutent alors à celles qui indiquent la fertilité. Etant donné que le développement ovarien est généralement concomitant avec différents autres changements physiologiques, il est parfois difficile de déterminer la fonction d'un ou plusieurs composés dans les processus de communication.

#### *II.D.2.2 Signaux de fertilité : les reines manipulent-elles les ouvrières ?*

Il semblerait donc que la fertilité soit encodée intrinsèquement dans le profil en HCC chez les fourmis. En plus de corrélér à la fertilité, les HCC sont considérés depuis longtemps comme des candidats pour signaler le statut reproducteur des individus. Du fait qu'ils corrèlent généralement au développement ovarien, ils sont considérés comme des signaux honnêtes reflétant l'état de fertilité de leur émetteur. Cependant il existe une controverse sur la nature de ces signaux qui ont longtemps été vus comme une façon utilisée par la reine pour manipuler les ouvrières dans le but d'augmenter sa valeur adaptative personnelle au détriment de celle des ouvrières. A ce jour, aucune étude n'a pu mettre en évidence sans ambiguïté un tel phénomène (Heinze & D'Ettorre 2009; Keller & Nonacs 1993). Les nombreuses études menées sur les signaux de fertilité tendent à montrer que ces derniers constituent des signaux honnêtes qui permettent aux ouvrières de se comporter de manière à maximiser leur propre valeur adaptative ainsi que celle de la reine qui produit les signaux (Van Oystaeyen et coll. 2014). Keller & Nonacs (1993) exposent les différentes hypothèses et prédictions associées à une manipulation des ouvrières par la reine et proposent une série d'arguments allant à l'encontre d'un tel phénomène. Les auteurs définissent deux scénarios possibles de manipulation des ouvrières par les reines : dans un premier cas les reines peuvent produire des signaux qui inhibent la reproduction des ouvrières et contraignent ces dernières à élever leur couvain, dans un deuxième cas les reines produisent un signal malhonnête qui atteste d'un trait qu'elles ne possèdent pas (par exemple indiquant un appariement avec plusieurs mâles\*\* ou une haute fertilité). Dans les deux cas, les auteurs avancent que ces deux scénarios

---

\* Lorsqu'une reine est appariée plusieurs fois, en moyenne, les ouvrières ont tendance à être plus apparentées à leur frères qu'aux mâles produits par une demi-sœur. Ainsi on s'attend à ce que ces ouvrières empêchent leur demi sœurs de se reproduire (*policing*) ou bien à ce qu'elles détruisent le couvain de ces dernières. De cette



semblent peu probables car évolutivement peu stables. Dans le cas d'une phéromone de contrôle contraignant irrémédiablement les ouvrières à ne pas se reproduire et à s'occuper du couvain, on s'attend à ce que ces dernières évoluent des stratégies pour contrer les effets de cette phéromone. De plus, une inhibition du développement ovarien via des composés chimiques produits par la reine aurait toutes les chances d'affecter la reine elle-même. Une telle course à l'armement entre castes aurait des répercussions fortement délétères sur la productivité des colonies et serait donc contre-sélectionnée pour les reines comme pour les ouvrières. Dans le cas des signaux malhonnêtes produits par la reine, on s'attend à ce que les ouvrières soient sélectionnées pour ne pas utiliser ces signaux du fait de leur absence de fiabilité. En 2009, Heinze & D'Ettorre proposent de confronter les hypothèses et prédictions faites par Keller & Nonacs (1993) aux travaux expérimentaux réalisés sur ce sujet entre 1993 et 2009. Sur la base de ces études, les auteurs admettent qu'il est impossible de conclure en faveur ou en défaveur d'une manipulation des ouvrières par la reine.

#### *II.D.2.3 Signaux multi-fonction et modes d'action*

Quelle que soit la nature des signaux émis par les reines pour réguler la reproduction de la colonie, ces derniers doivent remplir différents rôles. La reine doit fournir aux ouvrières des informations leur permettant de réfréner leur reproduction et de contrôler celle des autres ouvrières du nid et doit déclencher le comportement de soin en faveur du couvain qu'elle produit. On peut donc prédire deux actions indispensables des phéromones de reines : un effet sur la physiologie à long-terme (effet *primer*) et un effet sur le comportement (effet *releaser*). La plupart des expériences menées jusqu'ici tendent à montrer que les HCC des reines pourraient assurer la fonction de phéromones de reine. Il semble en revanche peu probable que les deux effets *primer* et *releaser* soit la conséquence d'un unique composé et la complexité du profil des reines suggère que plusieurs composés devraient être impliqués dans l'une ou l'autre de ses fonctions ou bien dans les deux.

D'autre part, le contrôle de la reproduction des ouvrières peut également se faire par la reine soit via des interactions agonistiques dirigées vers les ouvrières qui ne réfrènent pas leur reproduction, soit par le cannibalisme des œufs pondus par ces ouvrières. Cependant ce comportement de *policing* par la reine ne semble possible qu'au sein de petites colonies où il est envisageable pour elle d'interagir avec la quasi-totalité des ouvrières.

---

manière, la reine n'est plus en conflit avec les ouvrières quant à la production de mâles et augmente sa valeur adaptative en produisant des sexués mâles.

Pour permettre la diffusion de l'information portant sur la présence d'une reine fertile au sein de colonies de grande taille, deux mécanismes ont été proposés : l'utilisation de phéromones signalant la fertilité ou la diffusion de cette information par les œufs pondus par la reine qui peuvent être répartis dans différentes loges du nid par les ouvrières (Endler et coll. 2004). Plusieurs études ont montré que les œufs pondus par les reines portent des HCC qui les différencient des œufs pondus par des ouvrières (Liebig 2010). Ebie et coll. (2015) suggèrent que la diffusion de cette information pourrait se faire par les larves plutôt que par les œufs chez *Novomessor cockerelli*. Cette espèce possède des nids composés (polydomie) ce qui implique que certaines ouvrières se retrouvent momentanément isolées de la reine, les auteurs proposent donc que les larves, qui sont régulièrement déplacées par les ouvrières entre les nids, pourraient indiquer la présence de la reine dans la colonie.

Les phéromones de reines permettant le contrôle de la division du travail reproductif n'ont été mises en évidence que chez quelques espèces de fourmis uniquement. Les effets de ces phéromones sont divers : soumission/attraction des ouvrières, inhibition de leur développement ovarien, inhibition de la maturation ovarienne chez d'autres reines.

#### *II.D.2.4 Mise en évidence des phéromones de reines chez la fourmi*

L'effet d'HCC produits par des reines sur le comportement ou la physiologie des ouvrières a été démontré strictement chez 5 espèces de fourmis. L'effet *releaser* des phéromones a été plus rarement mis en évidence que l'effet *primer*.

Holman et coll. (2010) ont mis en évidence chez *Lasius niger* que des ouvrières exposées à un alcane méthylé (le 3-méthylehentriacontane, 3-MeC<sub>31</sub>) produit en abondance par les reines voyaient leur développement ovarien diminué par rapport à un groupe contrôle exposé à d'autres HCC produits par la reine ou exposé à un solvant (hexane). En 2013, Holman et coll. étendent ce résultat à *Lasius flavus* chez qui les reines produisent du 3-MeC<sub>31</sub> en quantité supérieure par rapport aux ouvrières. Chez cette espèce également, l'exposition d'ouvrières à des quantités de 3-MeC<sub>31</sub> équivalentes à celles présentes sur la cuticule des reines entraîne une baisse de la fertilité de ces ouvrières. Il est important de noter que dans leur étude, Holman et coll. (2010) démontrent également que le 3-MeC<sub>31</sub> déclenche bien une réponse des neurones antennaires chez les ouvrières. Dans cette même étude, les auteurs testent également l'effet *releaser* du 3-MeC<sub>31</sub> en mesurant la réponse agressive des ouvrières lors de la présentation du composé synthétique sur une surface de verre. Cependant l'hypothèse testée n'est pas explicite (pourquoi la phéromone de reine diminue l'agressivité des ouvrières et

pourquoi les ouvrières sont agressives envers des hydrocarbures contrôlé) et ne démontre pas sans équivoque un effet *releaser* spécifique du composé.

Chez la fourmi *Odontomachus brunneus*, le (Z)-9-nonacosène est présent en plus grande quantité chez les individus reproducteurs (i.e. les reines et les individus reproducteurs). L'application topique de ce composé sur la cuticule d'une ouvrière déclenche chez les autres ouvrières un comportement de soumission (rétractation des antennes et immobilité) typique de celui exprimé par les ouvrières face à une reine chez cette espèce (Smith et coll. 2012). Cependant, la même étude ne met pas en évidence d'effet inhibiteur du (Z)-9-nonacosène sur la fertilité des ouvrières.

Enfin, très récemment, Van Oystaeyen et coll. (2014) ont montré que l'heptacosane (C<sub>27</sub>), le nonacosane (C<sub>29</sub>) et le 3-méthylénonacosane (3-MeC<sub>29</sub>) inhibent le développement ovarien des ouvrières chez la fourmi *Cataglyphis iberica*.

A l'heure actuelle, notre compréhension des phéromones de reines se rapporte à ces quelques exemples. Il est intéressant de noter que les composés qui ont été mis en évidence par ces différentes études ne sont pas de la même nature : on trouve des alcanes linéaires, des alcanes méthylés et un alcène. Cela suggère que les signaux utilisés par les reines pour réguler la fonction reproductive ne sont pas conservés entre les espèces et seraient apparus indépendamment au sein des différents taxons.

Van Oystaeyen et coll. (2014) démontrent justement dans leur étude qu'une série homologue d'alcane méthylés possède la même fonction inhibitrice du développement ovarien des ouvrières chez différents hyménoptères sociaux. Cependant, d'autres travaux expérimentaux suggèrent qu'il n'y aurait pas de conservation des signaux de fertilité entre les espèces, en particulier pour des taxons phylogénétiquement proches. Au sein du genre *Temnothorax* par exemple, les phéromones produites par la reine, qui inhibent le développement ovarien des ouvrières de la colonie, ne permettent pas d'inhiber la reproduction d'ouvrières appartenant à une autre espèce du même genre (Brunner et coll. 2011). De la même manière, Smith et coll. (2016) montrent que les différences d'HCC entre reines et ouvrières ne sont pas les mêmes chez quatre espèces différentes d'*Odontomachus* ce qui suggère que les composés utilisés par les reines pour signaler leur fertilité ne sont pas conservés au sein de ce genre. Par exemple, le (Z)-nonacosène identifié comme une phéromone de reine chez *O. brunneus* est absent du profil cuticulaire chez *O. ruginodis* et *O. haematodus* (Smith et coll. 2016).

*II.D.2.5 Synergie entre CHCs et autres composés*

Plusieurs expériences menées récemment par Smith et coll. (2015, 2016) montrent que l'information de fertilité pourrait être encodée de manière plus complexe que ce qui est généralement considéré. En effet, les auteurs ont mis en évidence une nouvelle classe de composés spécifiques des reines chez la fourmi *Odontomachus ruginodis*, absent chez les ouvrières : les dihydrofuranes (composés hétérocyclique comprenant un atome d'oxygène). Chez *O. ruginodis*, les ouvrières adoptent une posture de soumission en présence de la reine (voir plus haut, § sur *O. brunneus*) ce qui suggère que celle-ci diffuse une information chimique reflétant son statut reproducteur. Lorsque les auteurs présentent un extrait du profil cuticulaire d'une reine aux ouvrières, celles-ci réagissent comme lors de la présentation d'une véritable reine (par un comportement de soumission). Ni la fraction en HCC, ni celle contenant les dihydrofuranes ne permettent de reproduire ce résultat lorsqu'elles sont présentées séparément tandis que la combinaison des deux mime parfaitement une véritable reine. Smith et coll. (2016) en concluent que les deux fractions jouent un rôle synergique qui est à l'origine du signal de fertilité auquel répondent les ouvrières.

D'autre part, une autre expérience menée chez *O. brunneus*, montre que le (Z)-9-nonacosène, caractéristique des individus reproducteurs, ne déclenche une réaction de soumission chez les ouvrières que lorsqu'il est associé à un « contexte chimique » qui fait sens, en l'occurrence le profil en HCC d'un membre de la colonie (Smith et coll. 2015). La présentation du composé seul, ou du composé associé à un contexte chimique inapproprié (le profil d'un individu issu d'une colonie différente) ne déclenche pas de comportement de soumission chez une ouvrière.

La seule véritable phéromone de reine\* découverte chez les fourmis à ce jour est celle produite par les reines fonctionnelles chez *Solenopsis invicta* (Richard & Hunt 2013). Cette phéromone est constituée d'un mélange de composés présents dans la glande post-pharyngienne et dans la glande à poison des reines (Vargo & Hulsey 2000). Les composés issus de ces glandes, dont la nature précise n'est pas connue, entraînent une inhibition de la perte des ailes et du développement ovarien chez les reines vierges (Fletcher & Blum 1981). De plus, les glandes à poison produisent une grande quantité de pyranones (composés comprenant un noyau pyrane et un groupement cétone), dont deux d'entre elles suffisent à

---

\* « Véritable » dans le sens où ce mélange de composés possède différents effets *primer* et *releaser* qui permettent d'expliquer la quasi-totalité de la régulation de la fonction reproductive chez *S. invicta* (mais voir Eliyahu et coll. [2011]).

provoquer l'attraction des ouvrières et déclenchent chez ces dernières des comportements de soin (Rocca et coll. 1983a, 1983b).

Une étude plus récente d'Eliyahu et coll. (2011) montre que l'état de fertilité des reines chez *S. invicta* est corrélé à la fois à la concentration de certains hydrocarbures cuticulaires (principalement des alcènes et des diènes) mais aussi à la concentration d'alcaloïdes issus de la glande à poison. De plus, ces deux groupes de composés varient quantitativement et qualitativement en fonction de la caste et de l'origine sociale (colonie monogyne ou polygyne) chez les reines et les ouvrières mais aussi en fonction du génotype du *Gp-9* chez les reines fonctionnelles (i.e. des reines inséminées possédant une activité de ponte). Les auteurs suggèrent que les variations des HCC pourraient en particulier encoder l'information du génotype du *Gp-9* chez les reines car la proportion du profil représentée par la somme des alcènes et des diènes est près de 20 fois supérieure chez les reines du génotype *Bb* par rapport aux reines de génotype *BB*. Cette différence énorme n'est perceptible que chez les reines fonctionnelles, l'étude montrant qu'une différence significative entre les reines de génotypes différents est perceptible à partir du 14<sup>ème</sup> jour de développement post-émergence (émergence du cocon). Une observation qui abonde dans le sens de l'hypothèse des auteurs est que les ouvrières de colonies polygynes, intolérantes aux reines de génotype *BB* (voir § sur l'organisation sociale chez *S. invicta*, partie I), commencent à agresser ces reines à partir de leur deuxième semaine de développement après la mue imaginale (éclosion du cocon).

Chez *S. invicta*, les reines recouvrent leur œufs de sécrétions issues de leur glande à poison (Vander Meer & Morel 1995), cette observation suggère à Eliyahu et coll. (2011) que ces composés pourraient avoir un rôle dans le signalement de la fertilité des reines.

Ce dernier exemple constitue un élément supplémentaire particulièrement convaincant pour affirmer que le signalement de la fertilité et les phéromones de reines ne constituent pas des signaux conservés chez les Formicidés. L'étonnante plasticité qui caractérise les espèces au sein de ce groupe semble fortement prévaloir sur leur histoire évolutive.

En conclusion, on peut remarquer que les phéromones de reines représentent un ensemble de composés dont les différentes actions sur la physiologie et le comportement des ouvrières restent à confirmer chez un plus grand nombre d'espèces. Les HCC représentent de bons candidats pour véhiculer l'information de fertilité des reines puisque dans certains cas leur quantité corrèle avec l'état de fertilité. Cependant cette corrélation n'est pas systématique en fonction des espèces étudiées et le véritable lien (physiologique) entre le développement

ovarien et le profil en HCC reste inconnu. Pour citer un exemple, chez les espèces de fourmis sans reine, le profil caractéristique d'ouvrière reproductrice (de *gamergate*) est acquis souvent avant que les ovaires ne commencent à se développer. Il est important de constater que de manière générale, les HCC corrént assez bien avec l'état de maturité reproductive des individus même s'ils ne reflètent pas fidèlement le développement ovarien. En effet, même si les HCC ne corrént pas systématiquement avec l'état de fertilité instantané d'un individu (nombre d'oocytes dans les ovaires et leur taille), ils retranscrivent bien l'information sur la capacité d'une reine à assurer la reproduction du nid. Ce schéma semble assez logique lorsqu'on sait que le développement ovarien et le taux de ponte (représentant la fertilité instantané) sont soumis à des variations cycliques journalières et saisonnières. Si le profil en HCC devait refléter l'ensemble des variations de cette fertilité instantanée, les changements seraient incessants et donc peu informatifs pour les ouvrières. A l'inverse, si les HCCs reflètent la capacité de la reine à être fertile (c'est-à-dire le taux de ponte pour une longue période de temps), alors leurs variations seront moindres tant que la reine conservera cette fertilité « moyenne » et cette information est bien plus fiable pour les ouvrières.

## **II.E. Les interactions et la communication entre reines**

Les travaux consacrés à la communication entre reines (au sens de la caste morphologique) restent peu nombreux en comparaison de l'ensemble de la littérature sur les systèmes de communication chez les Formicidés. Nous avons vu plus haut que les ouvrières chez les fourmis sans reine sont capables de percevoir le statut de fertilité et/ou de dominance exprimé par d'autres ouvrières et qu'elles réagissent généralement en inhibant leur propre développement ovarien. Cependant, on peut supposer que les interactions entre reines vraies au sein de colonies matures sont régies par des mécanismes différents du fait que les reines sont des individus spécialisés dans la fonction de reproduction et qu'elles n'ont donc pas d'alternative à la fonction reproductive (elles gagnent rarement en valeur adaptative en sacrifiant leur reproduction comme le font les ouvrières). Cela est d'autant plus vrai que de nombreuses associations de reines comprennent des individus non apparentés.

Une source d'information majeure sur les stratégies comportementales utilisées par les reines dans ce contexte vient de l'étude de fondatrices au sein de fondations pléométriques.

Ce processus a été particulièrement bien étudié du fait de la facilité à collecter, observer et manipuler les reines fondatrices suite aux essaimage massifs caractérisant certaines espèces.

L'essentiel des travaux réalisés dans ce domaine s'est attaché à comprendre les déterminants du passage de l'état coopératif à un état strictement monogyne qui caractérise la plupart des fondations pléométriques (voir partie I). Certaines de ces études rapportent que ces reines sont capables d'utiliser les indices de fertilité produits par des co-fondatrices pour ajuster leur propre taux de ponte.

Chez *Solenopsis invicta*, les fondatrices au sein de fondations pléométriques investissent dans la ponte en fonction de la différence de poids entre elles et leurs co-fondatrices. Plus une reine est plus lourde que sa co-fondatrice, moins elle s'investit dans la production de couvain (Bernasconi & Keller 1998). Cela suggère que les reines au sein de ces fondations sont en mesure de répondre à la présence de co-fondatrices et semblent également pouvoir estimer la qualité de leur future compétitrice dans l'objectif de conserver des ressources pour pouvoir la combattre par la suite (Bernasconi & Keller 1997).

Chez *Lasius niger*, Holman et coll. (2010a) montrent que les reines ajustent leur investissement dans la production de couvain en fonction de la présence ou l'absence de co-fondatrices. Les auteurs mettent également en évidence que les reines qui remportent les combats possèdent une information chimique différente de celle portée par les reines vaincues et que les composés impliqués dans cette différence corrélient avec la productivité des reines\*. L'hypothèse serait que le profil chimique des reines gagnantes pourrait être un signal de la qualité ainsi que de la productivité de ces reines et que les ouvrières pourraient répondre à ce signal en biaisant l'issue du combat en faveur de la reine de plus haute qualité.

Une étude ultérieure d'Holman et coll. (2013) montre que les reines chez *L. niger*, qui produisent un hydrocarbure cuticulaire (le 3-méthylehentriacontane, 3-MeC<sub>31</sub>) à l'origine de l'inhibition du développement ovarien des ouvrières (Holman et coll. [2010b], voir plus haut), sont elles-mêmes affectées par cet hydrocarbure qui réduit leur propre développement ovarien. Cela montre bien que les reines sont sensibles aux phéromones de reines et que très certainement elles perçoivent aussi les signaux émis par d'autres reine indiquant leur fertilité.

Ortius & Heinze (1999) réalisent une étude sur les facteurs affectant la répartition de la reproduction entre reines au sein de colonies polygyne chez *Leptothorax* sp. A et montrent que les reines sont capables d'ajuster leur productivité en fonction de la fertilité des reines présentes au sein du même nid. Chez cette espèce, la répartition de la reproduction est

---

\* Dans l'étude d'Holman et coll. (2010a), les auteurs manipulent la fertilité des reines en ajoutant et en retirant du couvain aux reines au sein de fondations haplo- ou pléométriques et constatent que certains HCC changent de concentration en fonction de ce traitement.

déterminée par des interactions agonistiques entre les reines à l'issue desquelles, l'individu dominant monopolise l'intégralité de la fonction reproductive. En augmentant expérimentalement la fertilité d'une des reines au sein de la colonie, les auteurs montrent que la phase de combats disparaît et que la reine la plus fertile devient automatiquement la reproductrice du nid. Ce résultat suggère que l'état de fertilité de l'individu dominant est transféré par voie chimique (pas d'interaction nécessaire) et que les reines moins fertiles perçoivent et interprètent ce signal de fertilité en réprimant leur propre reproduction. On retrouve ici le même type de phénomène décrit plus haut sur le signalement de la fertilité et/ou de la dominance par les ouvrières chez les fourmis sans reine.

Une étude réalisée chez des reines fondatrices de *Neoponera* (anciennement *Pachycondyla*) *villosa* montre que ces dernières semblent reconnaître individuellement une co-fondatrice via une information chimique (D'Ettorre & Heinze 2005). Une étude ultérieure montre que ces reines, ainsi que celles d'une espèce proche du même genre (*N. inversa*) retiennent cette identité individuelle durant 24 heures de séparation (Dreier et coll. 2007). Les auteurs de ces deux études avancent que cette capacité cognitive permet aux reines d'éviter des combats inutiles en ajustant précisément leur comportement en fonction de l'identité de l'individu rencontré. (Dreier & D'Ettorre 2013) montrent que cette capacité n'est pas présente chez des reines fondatrices de *Lasius niger* au sein de fondations pléométriques. Ces fondations n'étant pas caractérisées par la présence d'une hiérarchie de dominance entre les reines, ce résultat renforce l'hypothèse que la reconnaissance individuelle est bien un trait qui a évolué dans le contexte d'associations de reines établissant une relation de dominance.

A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux capacités de perception des reines et aux signaux qu'elles pourraient utiliser pour ajuster leur comportement vis-à-vis d'autres reines. Il est important de citer le résultat obtenu par Smith et coll. (2011) qui montre que les ouvrières chez *Aphaenogaster cockerelli* reconnaissent le statut reproducteur sur la base d'un hydrocarbure cuticulaire (le pentacosane, n-C<sub>25</sub>) tandis que les reines ne semblent pas reconnaître un individu reproducteur sur la base de ce seul composé. Il est donc possible que les reines n'utilisent pas les mêmes signaux que les ouvrières pour déterminer le statut de fertilité d'une autre reine.

Il paraît donc opportun de tenter de comprendre quels sont les signaux utilisés par une reine pour évaluer la qualité d'une reine compétitrice et parallèlement de décrire les règles comportementales utilisées par une reine en réponse à ces signaux. La capacité d'individus à



estimer la qualité de rivales lors d'une confrontation dans le but de monopoliser une ressource indivisible constitue un champ de recherches vaste bénéficiant d'un cadre théorique bien développé. La compétition entre reines fondatrices semble s'intégrer parfaitement à ce cadre puisque les reines se battent jusqu'à la mort dans le but de s'accaparer l'intégralité de la fonction reproductive du nid. Bien que certaines études aient suggéré que les ouvrières pouvaient participer à l'exécution des reines, il semblerait que ce soient principalement ces dernières qui déterminent l'issue des combats, les attaques des ouvrières n'influençant pas l'issue des combats (Adams & Balas 1999) ou n'intervenant que pour éliminer l'individu le plus blessé (Aron et coll. 2009).

Une caractéristique importante à déterminer lors de confrontations entre compétiteurs est de savoir si les individus avant ou durant la confrontation sont en mesure d'estimer leur propre qualité et/ou la qualité de leur adversaire. Il serait donc intéressant de déterminer si les reines fondatrices calquent leurs règles comportementales sur une estimation de leur propre état (on parle alors de *self-assessment*) ou sur une comparaison entre leur propre état et celui de leur compétitrice (*mutual assessment*). Par ailleurs, il est également nécessaire de déterminer, en se basant sur les quelques travaux déjà réalisés, quels sont les signaux utilisés pour estimer la qualité d'une reine compétitrice.

A l'heure actuelle, une étude a été réalisée chez *Aphaenogaster senilis* pour déterminer si des reines sont bien capables d'estimer la capacité à combattre d'une compétitrice (Cronin & Monnin 2010). Chez cette espèce, les ouvrières élèvent de nouvelles reines lorsque la reine de la colonie meurt et celles-ci s'engagent dans des combats létaux pour obtenir le monopole de la reproduction. Ces nouvelles reines sont des sœurs (entre elles et vis-à-vis des ouvrières) ce qui implique que les ouvrières ne retirent aucun avantage dans le monopole de la reproduction par une reine ou par une autre et une étude antérieure a montré que la reine qui éclot en premier devient dominante et gagne généralement le combat. Les auteurs ont manipulé la capacité de combattre des reines dominantes (premières écloses) en leur incisant une mandibule dans le but d'observer si cet handicap modifiait à la fois le comportement des reines compétitrices ainsi que le comportement des reines opérées. Cependant, l'ablation n'a pas eu d'influence ni sur l'issue des combats ni sur le comportement des reines (les compétitrices et celles ayant subi l'ablation) et les reines dominantes ont gagné la majorité des combats. Les auteurs proposent que les combats entre reines soient ritualisés et que donc il n'y ait pas d'influence de la qualité des reines sur l'issue des combats. Les reines nées en second, les subordonnées, semblent ne pas répondre aux attaques des reines dominantes ce

qui s'apparente à du suicide. Les auteurs expliquent cela par le fait que les reines sont apparentées et que de véritables combats pourraient mener à la mort des deux individus ce qui serait une perte de valeur adaptative pour l'ensemble des individus. En revanche, en se laissant mourir, les reines subordonnées bénéficient de la valeur adaptative indirecte fournie par la reproduction de leur sœur qui a monopolisé la reproduction du nid.

Les interactions entre reines fondatrices diffèrent de cet exemple puisque les individus sont non apparentés, on ne s'attend donc pas à observer de comportements ritualisés entre les reines.

Le système de communication chez les fourmis est donc particulièrement bien étudié même si de nombreux aspects méritent de plus amples investigations. Un élément crucial pour accroître notre compréhension de l'organisation sociale est de comprendre comment le développement ovarien modifie la capacité de perception des individus. En d'autres termes, comment les individus reproducteurs réagissent aux indices de fertilité dont on a montré qu'ils peuvent modifier le comportement et la physiologie des ouvrières (stériles). Cette question permettrait de comprendre les mécanismes qui régissent les interactions entre reines au sein de colonies polygynes.

La deuxième difficulté que soulèvent les systèmes de communication basés sur une information olfactive consiste à déterminer quels éléments sont activement perçus par les individus et comment différentes informations nécessaires à l'expression d'une réponse comportementale adaptée sont encodées à partir d'un pool d'éléments communs. Nous avons vu que la nature (i.e. classe) des éléments chimiques peut permettre de séparer des informations de nature différente (S. J. Martin & Drijfhout, 2009). Cependant ce mécanisme ne peut être étendu à l'ensemble du groupe des Formicidés à l'heure actuelle car il a été testé uniquement chez une espèce dont le profil cuticulaire se prête aisément à la synthèse et aux analyses chimiques appropriées. De plus, l'étude de Brandstaetter et coll. (2011) ouvre des perspectives intéressantes quant aux mécanismes neurophysiologiques permettant de transformer une information olfactive complexe (dans le sens où elle comprend plusieurs dizaines de composantes) en un signal électrique interprétable par l'individu.

# OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le présent travail de thèse propose d'étudier comment les processus de communication impliqués dans les interactions inter- et intra-castes chez les fourmis diffèrent en fonction de l'organisation sociale de la colonie (c'est-à-dire en fonction du nombre de reines fonctionnelles présentes dans le nid). En effet, dans le contexte de la polygynie secondaire (voir figure 1), qui constitue l'une des principales voies d'accès à la polygynie chez les fourmis, la décision des ouvrières d'accepter ou non une reine supplémentaire va déterminer le nombre d'individus reproducteurs au sein de la colonie. Dans un second temps, lorsqu'une reine supplémentaire est acceptée, l'issue des interactions entre cette dernière et la reine résidente déterminera le régime de reproduction de la colonie (c.-à-d. le nombre de reines fonctionnelles participant à la reproduction de la colonie).

***L'hypothèse que nous formulons est donc que l'organisation sociale de la colonie pourrait être déterminée par le résultat de ces interactions et donc par le produit des processus de communication inter- et intra-castes.***

Ainsi, nous avons cherché à déterminer les règles qui président à la prise de décision des ouvrières quant à l'acceptation d'une reine supplémentaire ainsi que les règles comportementales qui régissent les interactions entre reines. Parallèlement, nous sommes intéressés à l'identification des signaux utilisés par les individus lors de ces processus de prise de décision.

Pour tester notre hypothèse, nous avons utilisé comme modèle biologique principal la fourmi *Odontomachus hastatus* qui présente comme particularité une organisation sociale variable. Cette caractéristique offre la possibilité intéressante d'une étude comparative des processus de communication inter- et intra-castes entre colonies monogynes (une seule reine) et polygynes (plusieurs reines) au sein d'un même taxon. Dans le cadre de l'étude des interactions entre reines, nous avons également réalisé des expériences chez des reines fondatrices de l'espèce *Lasius niger* car ce modèle nous offrait des possibilités en matière de manipulations expérimentales qui étaient inexistantes chez *O. hastatus*. De plus, cette espèce fait l'objet d'une littérature abondante et donc d'un contexte théorique important en particulier dans les domaines de la communication chimique et des interactions inter- et intra-castes.



### III. PRÉSENTATION DES MODÈLES BIOLOGIQUES

#### III.A. La fourmi *Odontomachus hastatus*

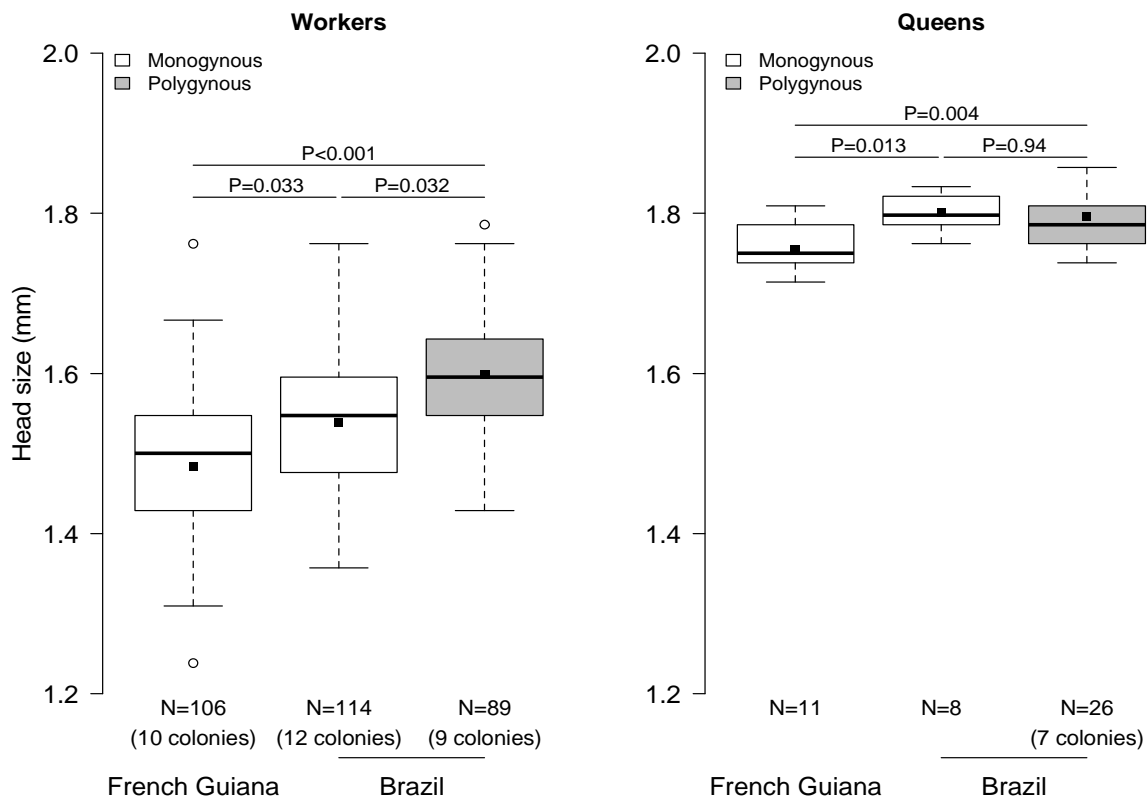
*Odontomachus hastatus* (Fabricius) est une fourmi de la sous-famille des Ponérines. Cette sous-famille, dont la plupart des espèces vivent dans des milieux tropicaux, constitue un taxon basal de la famille des Formicidés. De ce fait, de nombreuses espèces de Ponérines ont conservé des caractères ancestraux comme un dimorphisme faible entre les individus reproducteurs et les ouvrières stériles. *O. hastatus* vit dans les milieux tropicaux humides d'Amérique du Sud et d'Amérique Centrale. C'est une espèce arboricole dont l'écologie est peu connue. Au Brésil, les nids sont situés principalement à la base du système racinaire de broméliacées (genre *Vriesia* principalement), généralement épiphytes (Camargo & Oliveira, 2012). En Guyane Française, les nids sont construits à partir de litière accumulée au niveau de lianes ou de branches d'arbres, à la base de palmiers (*Asplenium*, *Cyclanthus*, *Philodendron*) ou au niveau du système racinaire de plantes épiphytes (*Geonoma*, *Astrocaryum*, *Bactris*) (Jeanson & Fourcassié, non publié).

*O. hastatus* est une espèce principalement insectivore dont les ouvrières chassent des proies dans la canopée dans un rayon de 8 mètres autour de leur nid (Camargo & Oliveira, 2012). La chasse est individuelle et a lieu durant la nuit à partir de la tombée du jour jusqu'à l'aurore.

Les colonies sont de taille modeste (quelque centaines d'ouvrières, voir ci-dessous) et diffèrent dans leur organisation sociale en fonction de la localisation. En Guyane française, les populations étudiées présentent des colonies strictement monogynes (c'est-à-dire qu'une seule femelle désailée a été observée lors de la dissection du nid). Au Brésil, les colonies semblent être facultativement polygynes avec environ 40% des nids récoltés contenant plus d'une reine fonctionnelle (i.e. une reine pondant des œufs fertilisés). Le nombre de reines au sein des colonies polygynes est compris entre deux et vingt quatre (Raphaël Jeanson, communication personnelle). Les reines désailées au sein des colonies polygynes sont généralement fécondées et la reproduction est régulée par des interactions de dominance entre individus reproducteurs dont le cannibalisme des œufs (Oliveira et al., 2011).

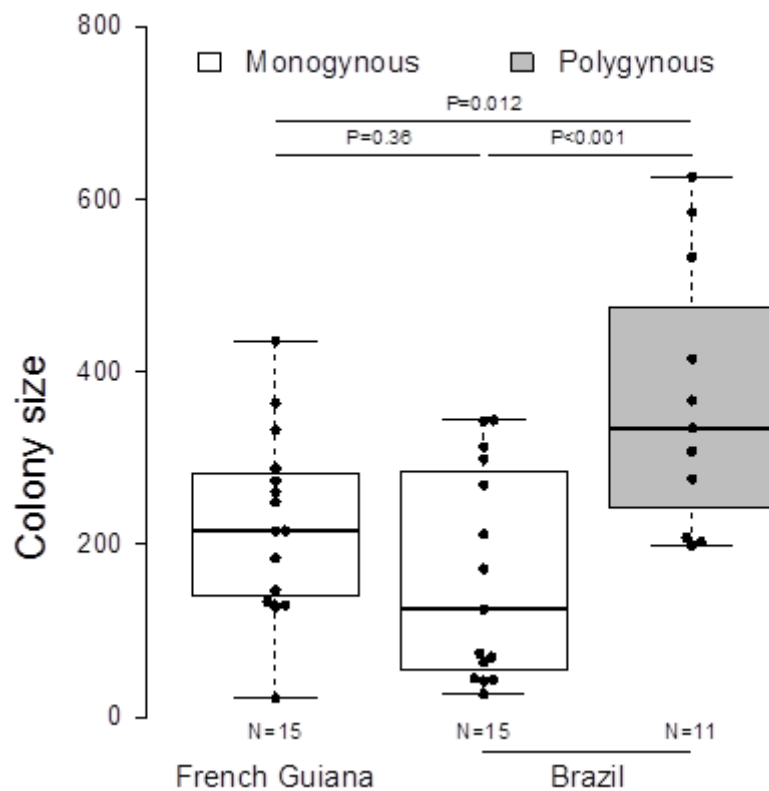
Durant une étude réalisée en 2012, Vincent Fourcassié, Paulo S. Oliveira et Raphaël Jeanson ont comparé différents traits sur des colonies d'*O. hastatus* au Brésil et en Guyane Française. L'objectif de cette étude était de mettre en évidence des différences entre les colonies des deux zones qui pourraient être associées aux différentes formes sociales qui caractérisent ces deux populations (syndrome de monogynie et/ou de polygynie).

Les ouvrières des colonies brésiliennes sont plus grandes que celles des colonies guyanaises et au Brésil, les ouvrières issues de colonies polygynes sont légèrement plus grandes que celles issues de colonies monogynes (Figure 10, gauche). On ne constate pas de différence de taille significative entre les reines monogynes et polygynes au Brésil, cependant, les reines brésiliennes sont légèrement plus grandes que celles de Guyane française (Figure 10, droite). Ces résultats vont à l'encontre de ce qui est reporté dans la littérature car le syndrome de polygynie est défini en partie par la petite taille des ouvrières et des reines par rapport aux individus issus de colonies monogynes obligatoires.



**Figure 10.** Tailles des ouvrières et des reines d'*Odontomachus hastatus* en fonction de la zone d'appartenance (Brésil/Guyane Française) et de l'organisation sociale de la colonie (Monogyne/Polygyne). La taille du corps est estimée par la mesure de la tête entre les deux yeux. Les valeurs de *P* des tests post-hoc de comparaisons multiples de moyennes (Tukey) sont indiquées. La ligne horizontale noire et le carré noir dans chaque boîte représentent respectivement la médiane et la moyenne de l'échantillon. La hauteur de la boîte donne l'espace entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> quartile. La moustache la plus haute (ou basse) s'étend jusqu'à la plus extrême valeur dans un intervalle d'1.5 fois la distance entre quartiles à partir du 3<sup>ème</sup> (ou du 1<sup>er</sup>) quartile. Les cercles représentent les valeurs extrêmes.

Une comparaison de la taille des nids montre que les colonies polygynes du Brésil sont plus grandes que les colonies monogynes brésiliennes et guyanaises (Figure 11). Les colonies monogynes guyanaises et brésiliennes possèdent des tailles similaires. Ce résultat suggère que les colonies polygynes du Brésil possèdent bien plusieurs reines fonctionnelles puisqu'elles produisent plus d'ouvrières que les colonies monogynes. La polygynie au Brésil est certainement due à l'adoption de reines supplémentaires par des colonies matures (polygynie secondaire). Si toutes les colonies au Brésil peuvent potentiellement adopter des reines (polygynie facultative), les colonies monogynes sont celles qui n'ont pas encore adopté de reine et, statistiquement, la probabilité d'avoir adopté une reine additionnelle est plus faible dans une jeune colonie que dans une colonie plus âgée.



**Figure 11.** Tailles des colonies d'*Odontomachus hastatus* en fonction de la zone d'appartenance (Brésil/Guyane Française) et de l'organisation sociale de la colonie (Monogyne/Polygyne). Les valeurs de  $P$  des tests post-hoc de comparaisons multiples de moyennes (Tukey) sont indiquées. La ligne horizontale noire dans chaque boîte indique la médiane de l'échantillon. Chaque point noir représente une taille de colonie. La hauteur de la boîte donne l'espace entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> quartile. La moustache la plus haute (ou basse) s'étend jusqu'à la plus extrême valeur dans un

intervalle d'1.5 fois la distance entre quartiles à partir du 3<sup>ème</sup> (ou du 1<sup>er</sup>) quartile. Les cercles représentent les valeurs extrêmes.

Si les colonies monogynes du Brésil étaient systématiquement plus petites que celles de Guyane, alors cela pourrait indiquer qu'elles sont plus jeunes. Cependant, on n'observe aucune différence significative entre les tailles de colonies monogynes entre le Brésil et la Guyane.

Une autre partie de l'étude des différentes populations d'*O. hastatus* consistait à tester l'hypothèse de la limitation des sites de nidifications (voir § sur la polygynie, pages 9 et 10) pour déterminer si ce paramètre pouvait expliquer les variations de l'organisation sociale entre le Brésil et la Guyane. Le nombre de sites de nidification potentiels au Brésil est nettement supérieur au nombre de sites présents en Guyane (Tableau 1). Ainsi il est peu probable que la polygynie secondaire au Brésil s'explique par un nombre limité de sites de nidification disponibles lors de la fondation. Les jeunes reines fondatrices qui dispersent au Brésil ont plus de chance de trouver un site qui convienne à la fondation que les reines fondatrices qui dispersent en Guyane. Cependant, l'estimation des sites de nidification potentiels ne prend pas en compte la qualité de ces sites, qui peut difficilement être estimée.

		Nids/ha	Nids potentiels nids/ha	Nombre de femelles ailées par nid		
				0	1	>1
Guyane Française	Inselberg	7.1	83.1	4	11	0
	Pararé	8.1	64.2	0	5	0
	<b>Pour les deux sites</b>	<b>7.6</b>	<b>74.3</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>0</b>
Brésil	Cardoso	26.8	1525.0	1	12	4
	Cananéia	10.8	716.7	1	4	7
	<b>Pour les deux sites</b>	<b>21.2</b>	<b>918.7</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>11</b>

**Tableau 1.** Densité des nids occupés par les colonies d'*Odontomachus hastatus* et des nids potentiels (nids inoccupés aux caractéristiques équivalentes à celles observées pour les nids occupés) en fonction de la zone considérée (Brésil/Guyane Française). Les trois colonnes de droites indiquent le nombre de reines présentes dans les nids occupés.

En conclusion de ces expériences préliminaire, nous pouvons conclure qu'*Odontomachus* est une espèce socialement polymorphe mais dont on ne connaît pas le degré de plasticité de la structure sociale.



### III.B. La fourmi *Lasius niger*

La fourmi *Lasius neoniger* (Linné) ou *Lasius niger*, appelée également fourmi noire des jardins est une petite fourmi (3-5 mm) de la sous-famille des Formicinés. Elle appartient au groupe *niger* contenant trois autres espèces morphologiquement très proches mais habitant des milieux très différents.

*L. niger* est commune en Europe, en Amérique du Nord et en Asie. Elle niche majoritairement dans les milieux urbanisés où elle colonise les jardins, les espaces sous les pavés, les dalles ou les pots de fleurs. Le nid est généralement sous-terrain et comprend une petite partie hypogée formée à partir de boulettes de terre agglomérées grâce aux sécrétions salivaires des ouvrières. C'est une espèce omnivore et opportuniste qui se nourrit de fruits, de graines de petits insectes morts et qui pratique fréquemment l'élevage de pucerons. Les colonies matures sont strictement monogynes (une unique reine) et peuvent comprendre plusieurs milliers d'individus (jusqu'à plus de 10 000). La reine, mesurant jusqu'à 9 mm, peut vivre plusieurs années (le record d'espérance de vie ayant été obtenu par une reine élevée en laboratoire aux E.U. durant 29 années). Les colonies se reproduisent lors de vols nuptiaux annuels massifs. Les reines dispersent et s'accouplent aux mâles puis cherchent un lieu pour débiter une fondation au sol. Elles perdent leurs ailes ou les arrachent grâce à leurs mandibules. La fondation peut être pléométrotique (18% des fondations dans Sommer & Hölldobler [1995]) mais les reines ne semblent pas rechercher ou éviter les autres fondatrices (Sommer & Hölldobler 1995), cependant on observe souvent des agrégats de reines lorsqu'on les confine dans une même boîte) et elle est claustrale (la ou les reines s'enferment et élèvent leur premières ouvrières en utilisant leurs réserves corporelles). Les reines perdent en moyenne 50% de leur poids durant la fondation (voir chapitre 4). Les fondations pléométrotiques sont plus productives que les fondations solitaires (Holman et coll. 2010a; Sommer & Hölldobler 1995).

Lorsque les premières ouvrières éclosent dans les fondations pléométrotiques, les reines s'engagent progressivement dans des combats violents. Une seule reine survit aux combats et monopolise la reproduction du nid.



# PLAN DE LA THÈSE

Cette thèse est organisée en cinq chapitres dont les objectifs sont décrits ci-dessous.

## **CHAPITRE 1 : Reconnaissance coloniale chez *Odontomachus hastatus* : étude comparative entre populations d'organisation sociale différentes.**

La fourmi ponérine *O. hastatus* présente des variations géographiques dans l'organisation sociale avec l'existence de populations strictement monogynes en Guyane française et facultativement polygynes au Brésil.

- Les colonies monogynes et polygynes du Brésil présentent-elles des différences d'agressivité en présence d'ouvrières de colonies différentes?
- Les colonies monogynes du Brésil et de Guyane présentent-elles des différences d'agressivité en présence d'ouvrières de colonies différentes?
- Le niveau d'agressivité varie-t-il en fonction de la distance chimique entre individus?

Ces problématiques sont abordées dans un manuscrit en préparation sur l'écologie, l'organisation sociale et la chimie cuticulaire de *O. hastatus*. L'essentiel des résultats comportementaux (caractérisation de l'agressivité des ouvrières) a été recueilli par Raphaël Jeanson, Vincent Fourcassié et Paulo Oliveira lors de missions sur le terrain en 2011 et 2012. J'ai réalisé l'intégralité des analyses chimiques en collaboration avec Felipe Ramon-Portugal.

## **CHAPITRE 2 : Chimie cuticulaire de la fourmi *Odontomachus hastatus* : études des colonies monogynes de Guyane française.**

Ce chapitre propose une étude préliminaire de la chimie cuticulaire d'*O. hastatus*.

- Comment varient les concentrations des différentes classes d'hydrocarbures entre et au sein des colonies dans une population monogyne de Guyane Française ?
- Quelle(s) classe(s) d'hydrocarbure pourrai(en)t sous-tendre les processus de reconnaissance coloniale chez *O. hastatus* ?

Ces résultats préliminaires seront enrichis en vue de faire l'objet d'une publication.

### CHAPITRE 3 : Reconnaissance de caste chez la fourmi *Odontomachus hastatus* : quel rôle pour les indices chimiques et comportementaux?

Chez *O. hastatus*, l'agressivité inter-coloniale est relativement modérée. Cependant le maintien de la monogynie en Guyane Française requiert l'exclusion de tout individu reproducteur supplémentaire.

- Quelle est la réponse comportementale des ouvrières résidentes de colonies monogynes lors de l'introduction d'individus de castes différentes?
- Les ouvrières discriminent-elles les reproducteurs de différents statuts de fertilité?
- Quelle information est utilisée par les ouvrières résidentes pour réagir à l'introduction d'un intrus : chimie ou comportement ?
- Les individus des différentes castes présentent-ils des différences dans les profils cuticulaires?

Ces problématiques sont abordées dans un article paru dans *Journal of Insect Physiology*: Berthelot K, Ramon Portugal F and Jeanson R. (2017) **Caste discrimination in the ant *Odontomachus hastatus*: What role for behavioral and chemical cues?** *J. Insect Physiol.*, 98:291–300

Cette étude a fait l'objet des deux communications:

*Communication affichée*

Berthelot K, Ramon Portugal F and Jeanson R. 2016 **Behavioural and chemical modalities of queen's adoption in the ant *Odontomachus hastatus***. Colloque de la Société Française pour l'Étude du Comportement Animal (SFECA), Tours, 8-10 juillet 2014.

*Communication orale*

Berthelot K, Ramon Portugal F and Jeanson R. 2016 **Preferential aggression and chemical signaling are putative determinants of monogyny in the ant *Odontomachus hastatus* (Ponerinae, Formicidae)**. Colloque européen de l'Union Internationale pour l'Étude des Insectes Sociaux, Helsinki (Finlande), 8-11 août 2016.

## **CHAPITRE 4: Initiation des interactions agonistiques et estimation mutuelle chez les reines fondatrices de *Lasius niger*.**

Les jeunes reines de *Lasius niger* peuvent s'associer lors de la fondation de nouvelles colonies mais elles s'engagent ensuite dans des interactions agonistiques létales conduisant à la survie d'une unique reine.

- Les reines modulent-elles leur décision d'attaquer en fonction de leur propre état physiologique et celui des reines rivales?
- Quels indices sont utilisés par les reines pour décider d'attaquer?

Ces questions sont abordées dans un article paru dans *Journal of Experimental Biology*:

Berthelot K, Ramon Portugal F and Jeanson R (2016) **Onset of fights and mutual assessment in ant founding queens.** *J. Exp. Biol.*, 220(5):750–753

Cette étude a fait l'objet de deux communications orales:

Berthelot K, Ramon Portugal F and Jeanson R. 2016 **How do *Lasius niger* queens perceive fertility cues depending on their own physiological state ?** Congrès de la Section Française de l'Union Internationale pour l'Étude des Insectes Sociaux, Tours, 26-28 août 2015.

Berthelot K, Ramon Portugal F and Jeanson R. 2016 **Interactions among *Lasius niger* founding queens: the role of nutritional state and cuticular chemistry.** Workshop "The number of queens: Causes and consequences", Fondation Fyssen, Paris, 17-18 mars 2016.

Cette étude fait suite à un travail préliminaire réalisé par Camille Amen (Master 1 Biosanté) que j'ai encadrée.

## **CHAPITRE 5: Étude de la perception antennaire d'hydrocarbures cuticulaires de reines par des reines chez *Lasius niger*.**

Afin d'accroître notre compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation des interactions agonistiques dans les associations des fondatrices de *L. niger*, il est pertinent de déterminer l'identité des composés cuticulaires perçus par les reines.

- Quels composés cuticulaires sont perçus par les reines ?
- Les ouvrières et les reines sont-elles sensibles aux mêmes composés cuticulaires?
- Ces questions ont été abordées lors d'un séjour de deux mois réalisé à l'Université de Ulm (Allemagne) sous la supervision du Professeur Manfred Ayasse.

Ces résultats préliminaires ne seront pas soumis pour publication.

# CHAPITRE 1

## RÉSUMÉ

Chez les fourmis, l'organisation sociale peut être un trait plastique entre espèces et au sein d'une espèce. Le nombre de reines dépend notamment des conditions environnementales et de l'histoire de vie de la colonie. Les espèces dites socialement polymorphes (c'est-à-dire présentant les deux types d'organisations sociales : une ou plusieurs reines) offrent un excellent modèle pour étudier les systèmes de reconnaissance chez les fourmis. En jouant sur la diversité génétique au sein de la colonie, la structure sociale d'un nid peut influencer les capacités de reconnaissance des individus. En effet, il est généralement prédit que les ouvrières d'espèces polygynes devraient posséder une variabilité importante dans leurs indices de reconnaissance et, conséquemment, qu'elles devraient être plus tolérantes envers les individus n'appartenant pas à leur colonie.

Ce chapitre est consacré à l'étude de la reconnaissance coloniale chez la fourmi *O. hastatus* qui présente des variations géographiques dans la structure sociale: les colonies de Guyane Française sont strictement monogynes tandis que les colonies au Brésil sont monogynes ou polygynes. Nous avons étudié deux sites distants d'environ 6 km au Brésil et en Guyane pour examiner si les ouvrières présentent des différences dans les niveaux d'agressivité lors de rencontres dyadiques. Nos résultats montrent que la structure sociale (monogynie vs. polygynie) n'influence pas l'agressivité des colonies et que les ouvrières d'*O. hastatus* sont généralement tolérantes envers les individus issus de colonies distantes. En outre, la caractérisation des profils en hydrocarbures cuticulaires souligne l'existence d'une similarité qualitative entre colonies et révèle l'existence de différences quantitatives prononcées entre les différents sites.



**Nestmate recognition in the ant *Odontomachus hastatus*: a comparative study between populations with different social structures**

Kévin BERTHELOT<sup>1</sup>, Claudia BOTTCHER<sup>2</sup>, Paulo S. OLIVEIRA<sup>2</sup>, Vincent

FOURCASSIÉ<sup>1</sup> and Raphaël JEANSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

## ABSTRACT

In ants, nestmate recognition allows individuals to display differential behaviours toward kin and non-kin. Earlier studies reported that the intensity of aggression between non-nestmates can vary with chemical, genetic or geographical distances between colonies and that the social structure of colonies (monogyny vs. polygyny) can further modulate the behavioral response during pairwise encounters. Few studies however addressed nestmate recognition in species characterized by the co-occurrence of monogyny and polygyny in some populations and the exclusive presence of monogyny in other populations. This study aimed at filling this gap by investigating nestmate recognition in the ant *Odontomachus hastatus*. This species is strictly monogynous in French Guiana but it is facultatively polygynous in southeast Brazil. In each country, we studied two sites distant of about 5 km. We conducted pairwise encounters between colonies within sites, between sites and between countries. In parallel, we characterized the cuticular profiles of workers from a subset of colonies collected at each site. We found no influence of the social structure on the outcome of encounters and we detected no difference in the cuticular profiles between monogynous and polygynous colonies. Although cuticular profiles apparently comprise sufficient information to discriminate colonies from different sites, workers do not substantially modulate their behavioural response while they fiercely attacked heterospecific individuals. Overall this suggests that workers of *O. hastatus* were generally tolerant toward conspecifics, irrespective of their geographical or chemical distances.

## INTRODUCTION

In social species, kin recognition allows group members to behave differently toward related and unrelated individuals (Mateo 2004). Depending on contexts and species, the outcome of encounters between unrelated individuals can range from peaceful interactions to overt fights. In ants, studies investigating nestmate recognition and aggressiveness between colonies yielded contrasting patterns. First, some species fiercely attack any conspecific intruders, irrespective of their population origin (Dabhi et al. 1996, Boulay et al. 2007). In other species the intensity of aggression varies with the geographical distance between colonies. In the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* for instance, workers display more amicable tolerant interactions with individuals from neighboring colonies than toward ants from distant colonies (Dimarco et al. 2010). This phenomenon, called the "dear enemy" effect, has been described across invertebrates and vertebrates (Temeles 1994). This concept postulates that encounters with workers of distant colonies represent a higher threat because the presence of these individuals might predict the arrival of the entire colony seeking a new territory. In contrast, close colonies could have developed stable relationships and behave amicably to limit the costs of frequent fights. At least two processes can underly the expression of the "dear enemy" effect. First, individuals can habituate to the cues emitted by neighbors during bouts of foraging as evidenced in *Pheidole* ants (Langen et al. 2000). An additional, but non-mutually exclusive, explanation is that neighbors are also more likely to share recognition cues because they are potentially genetically related due to their limited dispersal and/or because they live in a common environment that can comparably impact the production of recognition cues. An opposite trend, termed the "nasty neighbor" effect, is predicted to arise if competition for limited resources among neighboring colonies is intense, as it has been reported in the *Oecophylla smaragdina* where workers behave more aggressively toward neighbors than towards distant strangers (Newey et al. 2010).

The social structure of colonies (monogyny vs. polygyny) represents an additional factor that can also shape the intensity of aggressiveness toward non-nestmates. In polygynous colonies, the presence of multiple matriline increases the genetic diversity among workers and this can potentially influence the diversity of recognition cues between nestmates (Martin et al. 2009). One possible consequence is that workers from polygynous colonies have lower acceptance thresholds and are more tolerant toward non-nestmate conspecifics. The deployment of comparative studies in species showing social polymorphism (co-occurrence of monogyny and polygyny) provided contrasting results. In some species, workers from

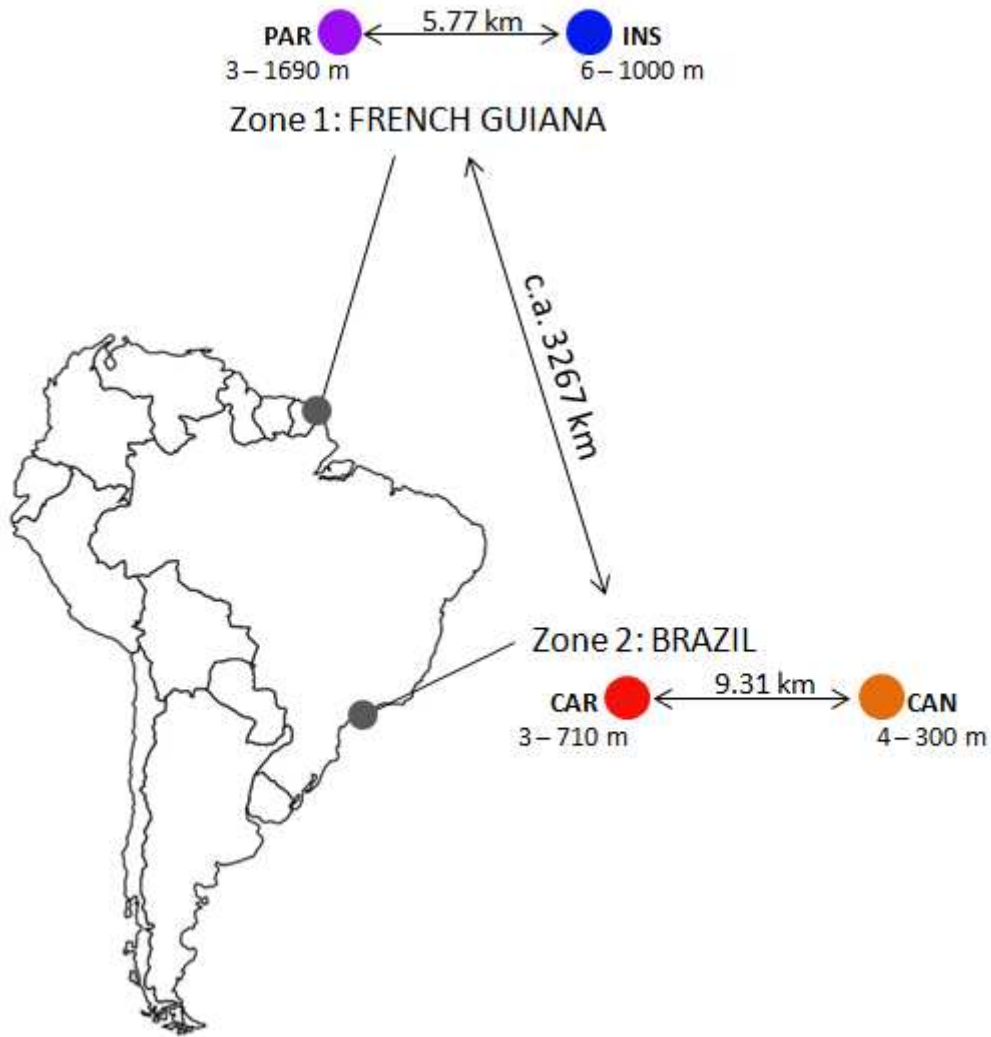
polygynous colonies have been shown to be less aggressive than workers from single-queen colonies when they were confronted to non-nestmate queens (Sundström 1997) or workers (Keller and Passera 1989, Starks et al. 1998, Fournier et al. 2016). Other studies however failed to find similar patterns, which indicates that a higher acceptance of non-nestmates in polygynous colonies is not a general rule (*queens*: Meunier et al. 2011; *workers*: Rosset et al. 2007, Helanterä et al. 2011).

In this context, the present study addressed nestmate recognition in the ponerine ant *Odontomachus hastatus* (Fabricius). This species shows variations in its social structure: colonies comprise a single or several reproductive females in southeast Brazil (50% of colonies containing more than dealate females: Jeanson unpublished data, Oliveira et al. 2011) but always a single queen in French Guiana (Jeanson, unpublished data). This system is rather unique because it allowed us to compare nestmate recognition between monogynous and polygynous colonies from the same population but also between monogynous colonies from socially polymorphic and strictly monogynous populations. We investigated the influence of social structure (monogyny *vs.* polygyny) on aggressiveness during pairwise confrontations between workers. Both in Brazil and French Guiana, we next examined the reaction of workers toward non-nestmates of colonies collected in the same site (distance <1 km) and in distant sites (distance >5 km). Because of the existence of polygynous colonies in Brazil, we predicted that workers from French Guiana would be less tolerant toward intruders than workers from Brazil. We characterized the cuticular profiles of workers of colonies from French Guiana and Brazil to examine the relationship between chemical distances and the patterns of aggression.

## MATERIALS & METHODS

### *Study Area*

In Brazil, fieldwork was conducted in the Cananéia Estuarine Lagoon Complex, located on the southern coast of São Paulo State. The region includes three islands (Cardoso Island, Cananéia Island and Comprida Island) surrounded by channels connected to sea (Schaeffer-Novelli *et al.* 1990). The predominant vegetation is Atlantic Forest, with patches of mangroves and restinga along the coast. The restinga forest has an open canopy formed by 5 to 15 m tall trees growing on a sandy soil, and abundant bromeliads growing both on the ground and as epiphytes (Barros *et al.* 1991). We studied two sites of restinga distant of approximately 8 km, one was located in the Parque Estadual da Ilha do Cardoso (25°07'S; 47°92'W, hereafter Cardoso, abbreviated CAR) and the other in Cananéia Island (24°99'S; 47°93'W, abbreviated CAN). The climate is warm and humid and the mean annual temperature and rainfall are 20.9°C and 3000mm, respectively (Barros *et al.* 1991). Our fieldwork was performed in November 2011 at Cardoso and in October 2012 at Cananéia. In French Guiana, the study was conducted in the Réserve Naturelle des Nouragues, a lowland rain forest, in the northern part of the Amazon rain forest. Fieldwork was performed in two sites in January 2012: Inselberg (4°05'N; 52°41'W, abbreviated INS) and Saut-Pararé/COPAS (hereafter Pararé; 4°02'N; 52°41'W, abbreviated PAR), located approximately 6 km apart. The vegetation is typical of the vast primary forest at low altitudes, with a few inclusions of different vegetation types (palmito-swamp forests, lianas forests and bamboo forests). The climate is tropical humid, and is characterized by a dry season (July–November) and a wet season (December–June) interrupted by a short dry season in March (Sarhou and Villiers 1998). Mean annual precipitation is 3,000 - 3,250 mm. The daily mean temperature ranges between 20.3 and 33.5°C.



**Figure 1.** Location of zones and distances between zones, sites and between colonies within sites. In bold are mentioned the different sites.

### *Nest collection*

Because *O. hastatus* has a nocturnal foraging activity (Camargo and Oliveira 2011), nests were collected during daytime to ensure the presence of all colony members. In total, we collected 49 nests of *O. hastatus*: 17 at Cardoso, 12 at Cananéia, 15 at Inselberg and 5 at Pararé. The spatial coordinates of all nests collected were recorded using a GPS (Garmin GPSmap 60CSx) (Figure 1). The composition of each colony (number of dealate females, winged males or females, workers, pupae and larvae) was determined immediately after collection. In the field, ants were maintained in plastic bottles with damp tissue and were fed with ant diet (Bhatkar and Whitcomb 1970). In the lab, colonies were housed in large plastic boxes containing dirt and were fed three times a week with ant diet and common green bottle flies (*Lucilia sericata*).

*Dyadic encounters*

We conducted dyadic encounters to assess aggression level between colonies. We considered the following types of encounters:

- Intracolony: two workers from the same colony
- Intercolony: two workers from different colonies
  - i) Intra-site: two workers from different colonies within the same site (Cananéia, Cardoso, Inselberg, Pararé)
  - ii) Inter-sites: two workers from different colonies between different sites within the same geographical area (Cananéia vs. Cardoso, Inselberg vs. Pararé)
  - iii) Inter-zones: two workers from different colonies between geographical areas (Brazil vs. French Guiana)
- Interspecific: two workers from different species (see below)

In addition, we examined the influence of the social structure on aggression by testing workers from different monogynous or polygynous colonies.

The day before confrontations, we marked none, one or both ants with a dot of colour paint (Edding 750<sup>®</sup>) on the abdomen. In pilot experiments we checked that painting did not influence the outcome of encounters. Ants were maintained overnight in a plastic container with damp tissue and synthetic ant diet. Dyadic encounters were performed in a circular arena (5.5 cm diameter x 1.7 cm height). The arena was separated in two halves with a piece of cardboard inserted in slits made into the wall of the arena. Each individual was selected haphazardly in the colony and gently deposited in one half of the arena. After a period of acclimation of approximately five minutes, the test began by gently sliding the cardboard. Each trial lasted 10 minutes. The arenas were washed with ethanol between trials. We simultaneously recorded up to ten confrontations using a camera (Sony Handycam Full HD 7.1 megapixels) placed above the arenas. Each worker was used only once and the order of dyads tested was determined randomly.

The social structure of all colonies of *O. hastatus* used in dyadic encounters were known except for colonies collected in November 2012 at Cardoso where only a sample of workers were collected on the surface of nests. In addition, workers of *O. hastatus* were tested against workers from different, but sympatric, species of *Odontomachus*. For logistical reasons, no interspecific confrontations were performed for ants collected in Cananéia. We used *O.*

*chelifer* at Cardoso and *O. haematodus* in French Guiana. These two species share several aggressive behaviours with *O. hastatus* (mandibular strike, sting), which permits relevant comparisons between inter and intraspecific encounters. Dyadic encounters within and between sites were performed in the field (Cardoso, Cananéia, Inselberg, Pararé) but confrontations between workers from different zones (Brazil vs. French Guiana) were performed in Toulouse in March 2012. We verified that the maintenance of colonies in the laboratory did not influence the outcomes of encounters (data not shown). Blinded methods were used to analyse video recordings except for interspecific encounters where physical differences between species were too obvious. The following interactions of increasing aggression were scored: ignore or low antennation (i.e. contacts in which neither ant showed any interest) (score 1), moderate to vigorous antennation (score 2), backing off (score 3), biting (score 4), mandible strike (forward lunge accompanied by a fast closing of the mandibles, score 5) and stinging (score 6). Scores of 1 and 2 were considered as non-aggressive while scores of 5 and 6 were regarded as highly aggressive. The aggression score assigned to each dyad was the strongest agonistic display (1 to 6) observed over 10 minutes. Only a subset of the colonies collected in the field was used for dyadic encounters.

Eight to 12 replications were performed for each combination tested except for interspecific encounters (5 to 11 replications). A total of 1294 dyadic encounters was performed and analysed.

### *Cuticular profiles*

For each colony of *O. hastatus* used for the characterisation of the cuticular profiles, three workers were sacrificed and their thorax were introduced into a 1 ml glass vial and soaked in hexane (Sigma-Aldrich, HPLC quality) for five minutes.

The extract was transferred to another 2ml autosampler vial and evaporated under nitrogen stream. The dry residue was re-dissolved in 50  $\mu$ l of hexane and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until the beginning of the chemical analysis. GC-MS analysis was performed on a mass spectrometer ISQ™QD Single Quadrupole GC-MS System (Thermo Fisher Scientific Inc., Villebon sur Yvette, France), fitted with a capillary column (Restek RTX-5MS 30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m film thickness, 5 % diphenyl and 95 % dimethylpolysiloxane) and a splitless injector ( $280^{\circ}\text{C}$ ). Ionization was by electron impact (70eV, source temperature:  $250^{\circ}\text{C}$ ). Helium was the carrier gas (1,2 mL/min). The oven temperature was maintained at  $70^{\circ}\text{C}$  after sample injection (2  $\mu$ l), then programmed at  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $180^{\circ}\text{C}$ , then  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $320^{\circ}\text{C}$  and held for



10 min. Samples were automatically injected using an autosampler AS300 (Thermo Fisher Scientific Inc., Villebon sur Yvette, France). For each GC sample, peak areas were calculated by manual integration using Xcalibur 2.2 SP1 48 software and were expressed as the percentage of the total peak area.

In the analysis, we only considered cuticular compounds  $\geq 1\%$  of the whole profile in at least two samples. A total of 33 compounds were included in the analyses. The relative abundance of each compound was transformed before statistical analysis using the log ratio transformation (Aitchison 1986) using the formula of  $Z_{i,j} = \ln[Y_{i,j}/g(Y_j)]$ , where  $Z_{i,j}$  is the transformed area of peak  $i$  for ant  $j$ ,  $g(Y_j)$  is the geometric mean area of all compounds of individual  $j$  and  $Y_{i,j}$  is the untransformed area of peak  $i$  for ant  $j$ . One colony from Cardoso (CAR19) showed an atypical cuticular profile in comparison to other colonies from Cardoso and was not included in subsequent analysis. Note however that the conclusions remained the same if this colony was included in the analysis (data not shown). In total, we analyzed the cuticular profiles of 4 colonies from Pararé, 13 colonies from Inselberg, 14 colonies (9 monogynous, 5 polygynous) from Cananéia and 24 colonies (20 monogynous, 4 polygynous) from Cardoso (note that we did not characterize the profiles of all colonies used for behavioral assays).

#### *Data analysis*

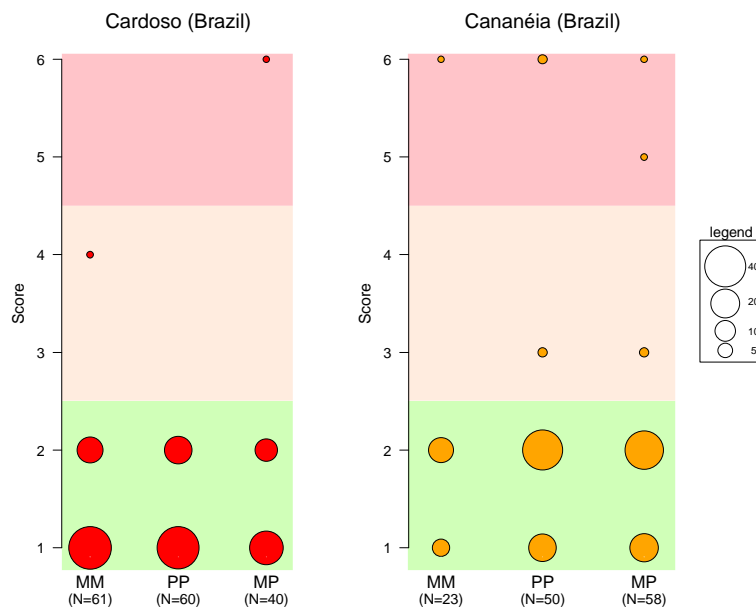
All analyses were performed using R 3.2.0 (R Development Core Team 2015). To compare the scores of aggression, we fitted a GLMM (function *glmer* in package *lme4*) with a Poisson error distribution and colony identity as a random factor. *P*-values were obtained with the function *Anova* implemented in the package *car*. We used Tukey post-hoc multiple comparison-of-means tests (*glht* function in *multcomp* package) to test pairwise differences. We ran a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLSDA) implemented in the package *RVAideMemoire* (Hervé 2014) to determine whether the cuticular profiles of workers segregated between sites. We next performed a permutational significance test based on cross-model validation using the function *MVA.test* implement in the package *RVAideMemoire* (n=999 permutations). We complemented this approach by using a hierarchical cluster analysis on Manhattan chemical distances between workers of the different colonies. We used the package *vegan* to calculate the chemical distance between colonies (Manhattan distances). Mantel permutation tests (999 permutations) were used to test the relationship between the matrices of chemical and geographical distances between

colonies. We used Spearman's rank correlations tests to examine the relationship between aggression scores and geographical or chemical distances.

## RESULTS

### *Dyadic encounters*

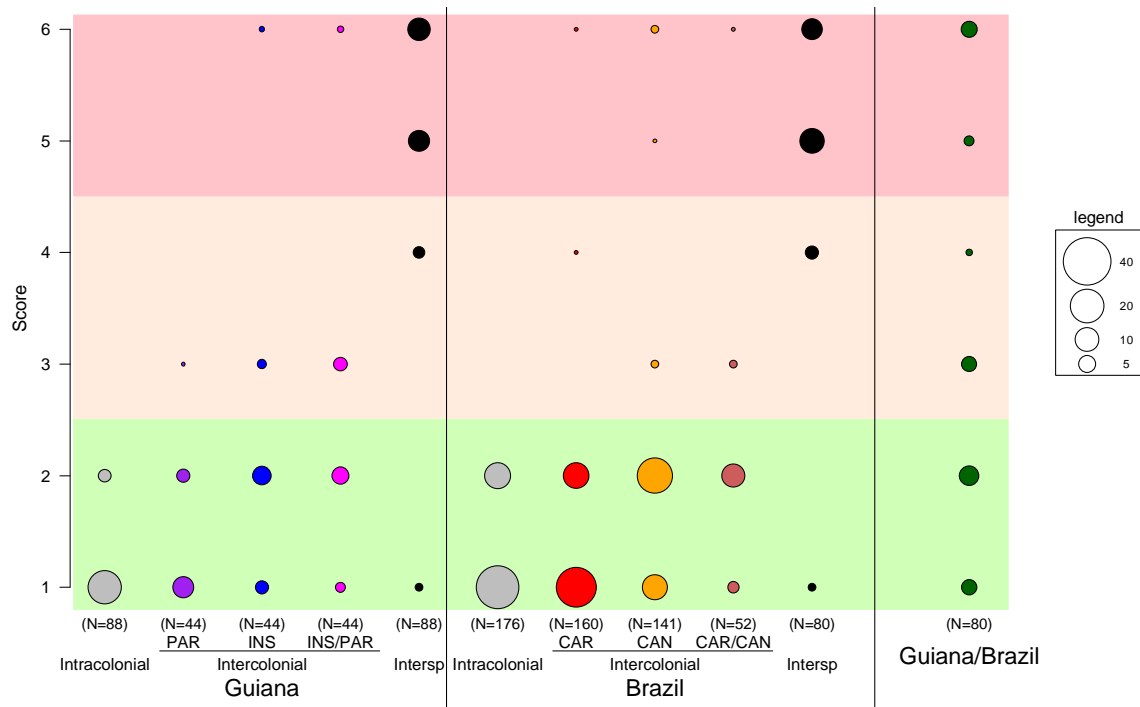
The intensity of aggression did not differ depending on the colonial social structure of the interacting workers ( $\text{Chi}^2=0.04$ ,  $df=2$ ,  $P=0.98$ ) but it varied between sites with individuals originated from Cananéia being more aggressive (i.e. reactive here because it was mainly antennations) than those from Cardoso ( $\text{Chi}^2=11.38$ ,  $df=1$ ,  $P<0.001$ ) (Figure 2). In subsequent analyses, we pooled the scores obtained for monogynous and polygynous colonies from each site in Brazil.



**Figure 2.** Plot of the scores of aggression for dyadic encounters between workers from monogynous or polygynous colonies in Brazil (MM: pairs of workers from monogynous colonies, PP: pairs of workers from polygynous colonies; MP: one worker from a monogynous colony and one worker from a polygynous colony). The size of each dot is proportional to the number of occurrence of each score. The green, orange and pink rectangles represent amicable interactions (antennations), moderate (backing-off, biting) and intense aggression (mandibular strike, sting), respectively.

Both in Brazil and French Guiana, the score of aggression varied depending on the type of encounters (French Guiana:  $\text{Chi}^2=269.36$ ,  $df=4$ ,  $P<0.001$ ; Brazil:  $\text{Chi}^2=422.15$ ,  $df=4$ ,  $P<0.001$ ). In French Guiana, workers from Inselberg showed higher level of aggression than

workers from Pararé (Figure 3, Table 1). In Brazil, workers from Cananéia were more aggressive during intra-site encounters than workers from Cardoso. Although workers from different sites displayed dissimilar levels of aggression toward non-nestmates, this difference mostly relies on a variation in the intensity of antennation (low vs. vigorous antennation) and workers rarely displayed the most aggressive behaviours (mandibular strike, sting). This markedly contrasts with interactions with heterospecific where the intensity of aggression was maximal (Figure 3, Table 1). Finally, the largest range in the scores of aggression was obtained for interactions between workers from colonies collected in French Guiana and Brazil.



**Figure 3.** Scores of aggression for dyadic encounters between workers. The size of each dot is proportional to the number of occurrence of each score. PAR, INS: encounters between workers from two colonies collected in Pararé and Inselberg (French Guiana), respectively. CAR, CAN: encounters between workers from two colonies collected in Cardoso and Cananéia (Brazil), respectively. INS/PAR indicates encounters between one worker from Inselberg and one worker from Pararé. CAN/CAR represents encounters between one worker from Cananéia and one worker from Cardoso. Guiana/Brazil indicates encounters one worker from Brazil and one worker from French Guiana. The green, orange and pink rectangles represent amicable interactions (antennations), moderate (backing-off, biting) and intense aggression (mandibular strike, sting), respectively.

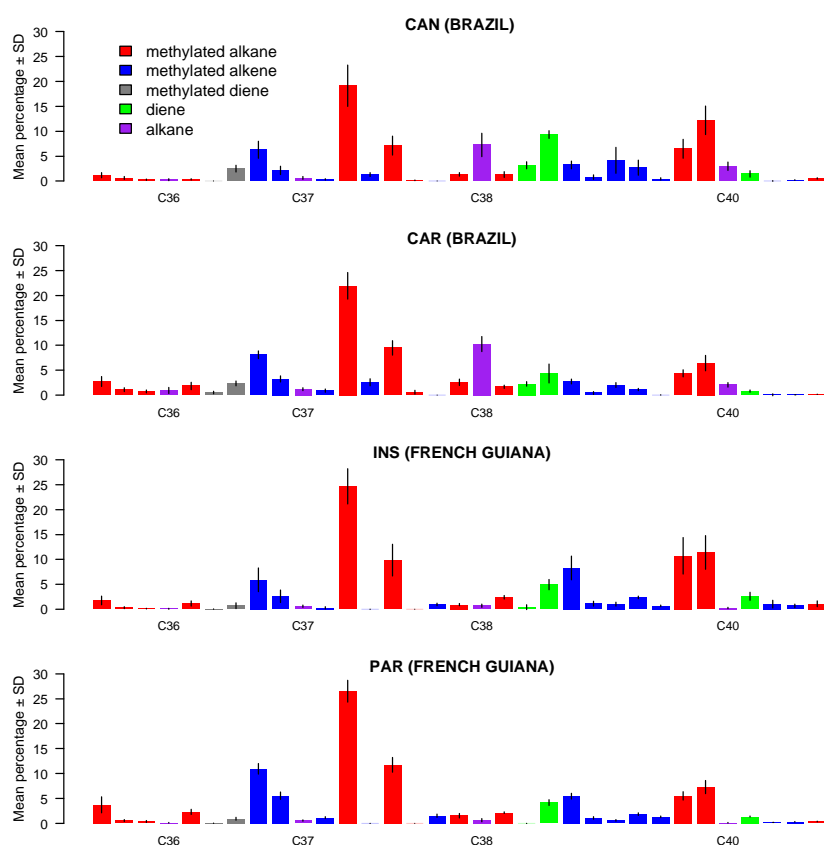
We next aimed at testing whether workers from French Guiana and Brazil displayed different levels of aggression. For each zone (Brazil or French Guiana), we pooled the scores obtained for intra-site encounters (INS and PAR; CAR and CAN). We found a significant effect of the type of encounters (intracolony, intra-site, inter-site and interspecific) on the intensity of aggression ( $\chi^2=688.93$ ,  $df=4$ ,  $P<0.001$ ) but no difference between Brazil and French Guiana ( $\chi^2=0.02$ ,  $df=2$ ,  $P=0.89$ ) (Figure 3). Overall, homospecific interactions in *O. hastatus* were amicable and show no difference between Brazil and French Guiana.

	Estimate	SE	z	P	
FRENCH GUIANA	Intracolony vs. INS	0.60	0.15	4.11	<0.001
	Intracolony vs. PAR	0.16	0.16	0.596	0.87
	Intracolony vs. INS/PAR	0.76	0.14	5.45	<0.001
	Intracolony vs. Interspecific	1.50	0.11	13.46	<0.001
	INS vs. PAR	-0.43	0.17	-2.61	0.064
	INS vs. INS/PAR	0.16	0.14	1.14	0.77
	INS vs. Interspecific	0.90	0.12	7.77	<0.001
	PAR vs. INS/PAR	0.60	0.16	3.69	0.002
	PAR vs. Interspecific	1.34	0.14	9.58	<0.001
	INS/PAR vs. Interspecific	0.75	0.11	6.79	<0.001
BRAZIL	Intracolony vs. CAN	0.38	0.09	4.16	<0.001
	Intracolony vs. CAR	0.05	0.09	0.56	0.98
	Intracolony vs. CAR/CAN	0.45	0.12	3.75	0.002
	Intracolony vs. Interspecific	1.40	0.08	16.83	<0.001
	CAN vs. CAR	-0.32	0.09	-3.52	0.004
	CAN vs. CAR/CAN	0.07	0.11	0.58	0.98
	CAN vs. Interspecific	1.02	0.08	12.90	<0.001
	CAR vs. CAR/CAN	0.39	0.12	3.27	0.01
	CAR vs. Interspecific	1.35	0.08	15.96	<0.001
	CAR/CAN vs. Interspecific	0.95	0.11	8.65	<0.001

**Table 1.** Summary of multiple comparisons of means for the different categories of dyadic encounters in Brazil and French Guiana.

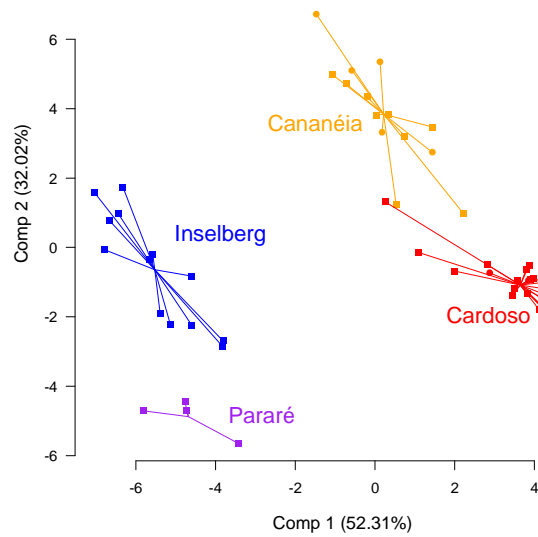
*Chemical analysis*

The cuticular hydrocarbons of *O. hastatus* comprise a mixture of linear and methylated alkanes, methylated alkenes and alcadiènes ranging in chain length from 35 to 44 carbons. Workers from Brazil and French Guiana mostly displayed quantitative differences with only two compounds (out of 33) found on workers from Brazil and two other hydrocarbons only present on the cuticle of workers from French Guiana. Similarly, one compound present on workers from Cardoso was absent on ants from Cananéia and another compound found on workers from Inselberg was absent on individuals from Pararé (Figure 4). The proportion of linear alkanes was five times larger on workers from Brazil (about 10%) than on individuals from French Guiana (about 2%).

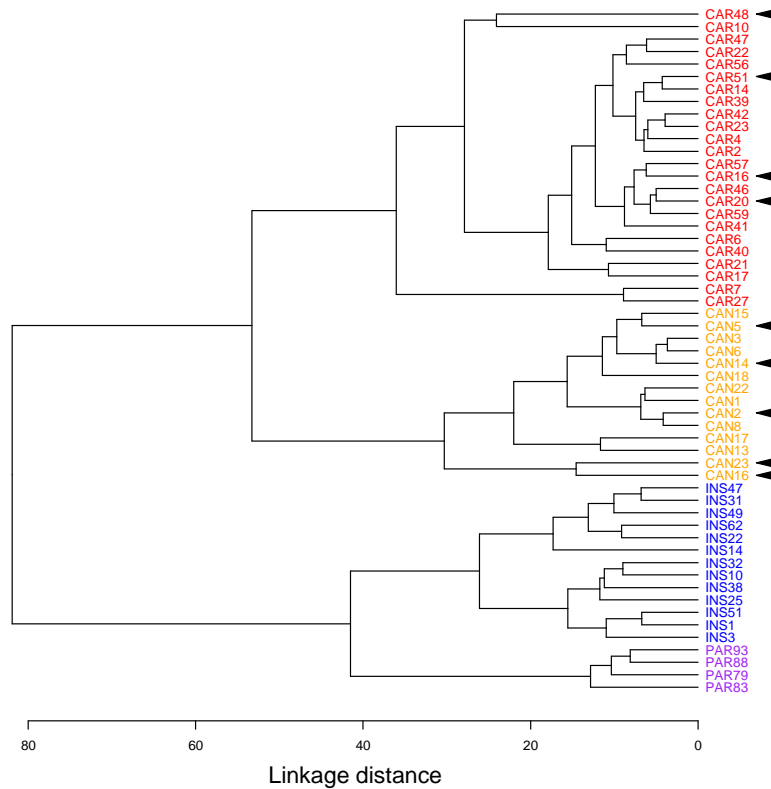


**Figure 4.** Mean  $\pm$  SD of the percentage of cuticular compounds for colonies from Brazil (Cardoso: N=24, Cananéia: N=14) and French Guiana (Pararé: N=4, Inselberg: N=13). Linear alkanes are indicated on the x-axis.

The multivariate analysis clearly discriminated cuticular profiles between the different sites with more than 93% of samples that were correctly reassigned in the cross-model classification (Figure 5). In Brazil, polygynous and monogynous colonies did not segregate (Figures 5, 6).



**Figure 5.** PLSDA plot of the cuticular profiles of workers from different sites. Symbols with a white dot indicate polygynous colonies. Circles and squares represent polygynous and monogynous colonies, respectively.

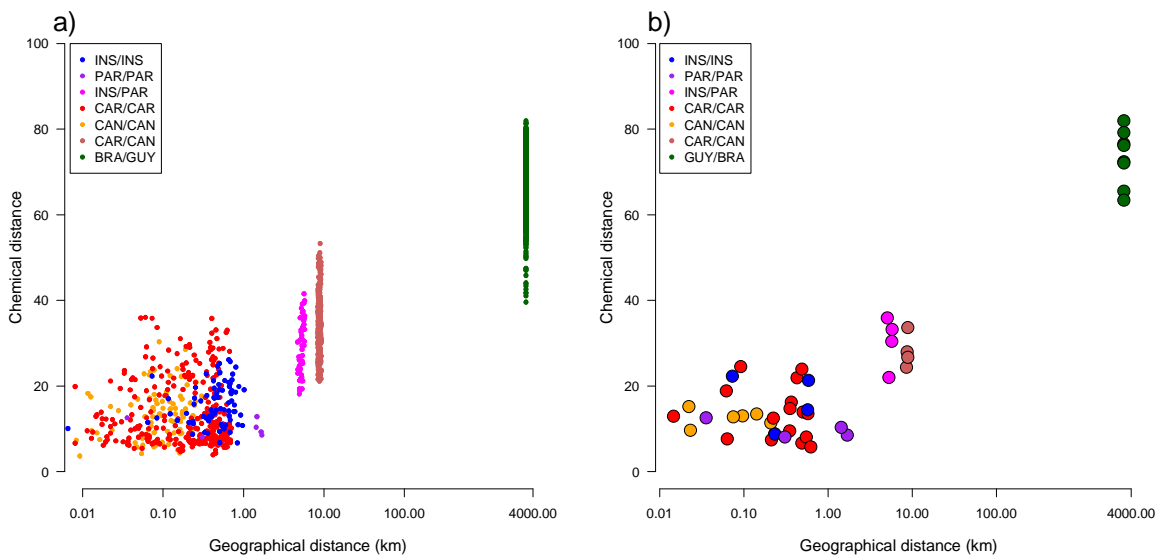


**Figure 6.** Hierarchical clustering analysis of the cuticular profiles of workers from different colonies and sites. The arrows indicate the polygynous colonies.

Location	<i>r</i>	<i>P</i>	Distance (range) (km)
Inselberg	0.21	0.04	0.006 - 1.02
Pararé	-0.43	0.95	0.03 - 1.69
Cananéia	0.14	0.14	0.004 - 0.30
Cardoso	0.002	0.44	0.003 - 0.71
French Guiana	0.75	0.001	0.006 - 5.77
Brazil	0.72	0.001	0.003 - 9.31
All colonies	0.89	0.001	0.003 - 3267

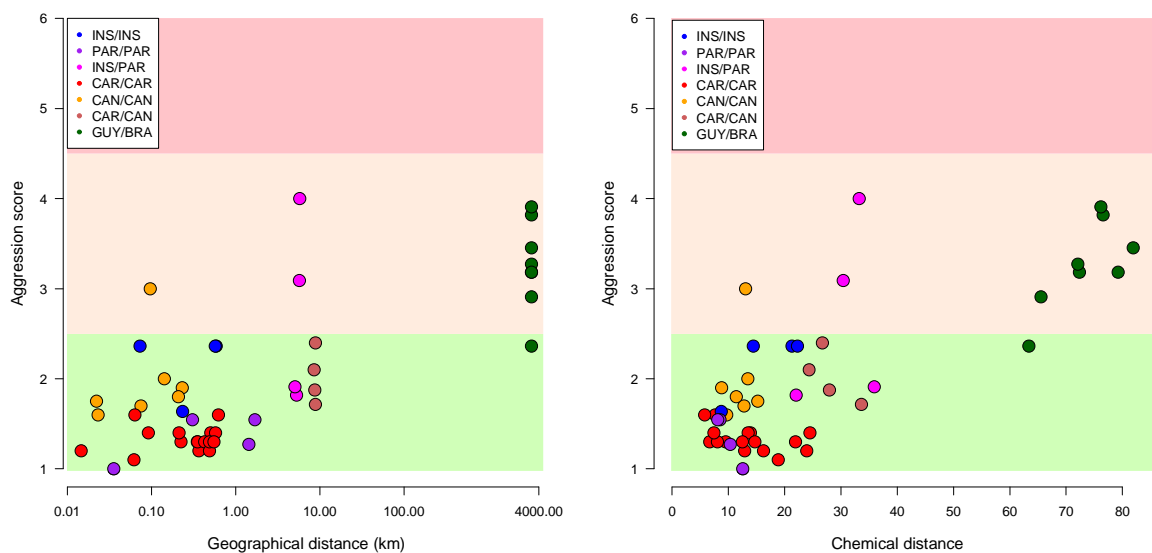
**Table 2.** Summary of Mantel permutation tests testing the correlation between geographical and chemical distances between pairs of colonies within sites (INS, PAR, CAN, CAR) or within zones (INS/PAR, CAN/CAR) and between geographical locations (BRA/GUY).

When considering all possible pairs of colonies for which we characterized the cuticular profiles, we evidenced no significant relationship between the chemical and geographical distances within site except for colonies from Inselberg where a marginal difference was detected (Table 2, Figure 7a). In contrast, chemical distance increased with geographical distance when we considered all possible pairs of colonies within Brazil or within French Guiana and all colonies sampled in both countries (Table 2).



**Figure 7.** Relationship between geographical and chemical distances for (a) all colonies and (b) colonies used for behavioural assays.

When considering only the subset of colonies used for behavioural assays, chemical distances increased marginally with geographical distances (Mantel permutation test:  $r=0.65$ ,  $P=0.05$ ) (Figure 7b). We next examined how aggression varied with geographical and chemical distances between pairs of colonies used for dyadic encounters (Figure 8). Aggression increased with geographical distances between colonies when interactions between workers from Brazil and French Guiana were considered (Spearman correlation test:  $\rho=0.59$ ,  $P<0.001$ ) or not (Spearman correlation test:  $\rho=0.34$ ,  $P=0.03$ ). Similarly, there was a positive correlation between aggression and chemical distances when the encounters between individuals from Brazil and French Guiana were included (Spearman correlation test:  $\rho=0.63$ ,  $P<0.001$ ) or not (Spearman correlation test:  $\rho=0.37$ ,  $P=0.02$ ).



**Figure 8.** Mean score of aggression as a function of the geographical and chemical distances between workers. Error bars are omitted for clarity. The green, orange and pink rectangles represent amicable interactions (antennations), moderate (backing-off, biting) and intense aggression (mandibular strike, sting), respectively.

## DISCUSSION

In this study, we investigated how the social structure of colonies and the distance between nests influenced the behavioural responses of workers in the ant *O. hastatus* during pairwise encounters. To our knowledge, no study examined nestmate recognition between colonies



across such a wide range of geographical distances in a species displaying variations in its social structure. In Brazil, where co-exist monogyny and polygyny in the same population, we found no influence of social structure on the intensity of aggression between workers. The absence of difference in the level of aggression between monogynous and polygynous colonies is consistent with the existence of similar cuticular profiles between colonies of both social forms. In Brazil, the sites where nests were collected were much more influential in the discrimination between colonies than their social structure (Figure 5).

We obtained similar patterns of aggression in Brazil and French Guiana where colonies are strictly monogynous. One conclusion of this study is that workers of *O. hastatus* behaved amicably in presence of conspecifics. It could be argued that the behavioural assays using pairwise encounters in neutral arena were not suitable to test nestmate recognition and the presence of colonial cues setting the context could have produced different outcomes (Roulston et al. 2003, Buczkowski and Silverman 2005). However we documented violent and frequently fatal during heterospecific encounters between *O. hastatus* and other species of trap-jaw ants (*O. haematodus* or *O. chelifera*). In addition, we showed in a companion study (see Chapter 2 of the present thesis) that the introduction of non-nestmate workers on intact nests did not elicit strong aggression and that aliens were either antennated or gently grabbed to be dropped off the nest. We are thus confident that the present results offered an appropriate picture of nestmate recognition in *O. hastatus*.

Keeping in mind that all cuticular compounds are not necessarily informative, our chemical analysis suggested that the blend of cuticular hydrocarbons contain sufficient information to allow workers to evaluate their chemical distances to intruders and to adjust their behaviour accordingly. Although our analysis revealed that the reaction toward intruders increased with chemical and geographical distances, this effect mostly relied on an increase in the strength of antennations but interactions rarely escalated to overt aggression. In this chapter, we estimated to what extent the cuticular profiles vary between colonies from similar or distant sites. In the next chapter, we investigate the range of variability in chemical cues within colonies and between colonies in a monogynous population in French Guiana.

A more comprehensive picture of the social organisation in *O. hastatus*, incorporating the ecological, morphometric and demographical data described above (Introduction, part III.a.), the results of the present and two next chapters will be provided in the general discussion of this dissertation.

## Acknowledgments

Funding was provided by CNRS, FAPESP and Nouragues Research Grant Program.

## REFERENCES

- Aitchison, J. (1986). *The Statistical Analysis of Compositional Data*. London: Chapman and Hall.
- Barros, F. D., Melo, M. M. R. F., Chiea, S. A., Kirizawa, M., Wanderley, M. D. G. L., & Jung-Mendaçolli, S. L. (1991). Caracterização geral da vegetação e listagem das espécies ocorrentes. *Flora Fanerogamica Da Ilha Do Cardoso*, 581.9B277.
- Beye, M., Neumann, P., Chapuisat, M., Pamilo, P., & Moritz, R. F. A. (1998). Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 43(1), 67–72.
- Bhatkar, A., & Whitcomb, W. H. (1970). Artificial diet for rearing various species of ants. *Florida Entomological Society*, 53(4), 229–232.
- Blomquist, G. J. (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. (G. J. Blomquist & A.-G. Bagnères, Eds.). Cambridge: Cambridge University Press. (pp. 19–35).
- Boulay, R., Cerdá, X., Simon, T., Roldan, M., & Hefetz, A. (2007). Intraspecific competition in the ant *Camponotus cruentatus*: should we expect the “dear enemy” effect? *Animal Behaviour*, 74(4), 985–993.
- Buczowski, G., Kumar, R., Suib, S. L., & Silverman, J. (2005). Diet-related modification of cuticular hydrocarbon profiles of the Argentine ant, *Linepithema humile*, Diminishes Intercolony Aggression. *Journal of Chemical Ecology*, 31(4), 829–843.
- Dahbi, A., Cerdá, X., Hefetz, A., & Lenoir, A. (1996). Social closure, aggressive behavior, and cuticular hydrocarbon profiles in the polydomous ant *Cataglyphis iberica* (hymenoptera, Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22(12), 2173–2186.
- Dimarco, R. D., Farji-Brener, A. G., & Premoli, A. C. (2010). Dear enemy phenomenon in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*: behavioral and genetic evidence. *Behavioral Ecology*, 21(2), 304–310.

- Fournier, D., de Biseau, J.-C., De Laet, S., Lenoir, A., Passera, L., & Aron, S. (2016). Social structure and genetic distance mediate nestmate recognition and aggressiveness in the facultative polygynous ant *Pheidole pallidula*. *PLOS ONE*, *11*(5), e0156440.
- Gordon, D. M. (1989). Ants distinguish neighbors from strangers. *Oecologia*, *81*(2), 198–200.
- Guerrieri, F. J., Nehring, V., Jorgensen, C. G., Nielsen, J., Galizia, C. G., & D’Ettorre, P. (2009). Ants recognize foes and not friends. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1666), 2461–2468.
- Hee, J. J., Holway, D. A., Suarez, A. V., & Case, T. J. (2000). role of propagule size in the success of incipient colonies of the invasive Argentine ant. *Conservation Biology*, *14*(2), 559–563.
- Helantera, H., Lee, Y. R., Drijfhout, F. P., & Martin, S. J. (2011). Genetic diversity, colony chemical phenotype, and nest mate recognition in the ant *Formica fusca*. *Behavioral Ecology*, *22*(4), 710–716.
- Hervé, M. (2014). RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions. URL: <http://cran.r-project.org/package=RVAideMemoire>.
- Hölldobler, B. (1976). Recruitment behavior, home range orientation and territoriality in harvester ants, *Pogonomyrmex*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *1*(1), 3–44.
- Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1977). The number of queens: An important trait in ant evolution. *Naturwissenschaften*, *64*(1), 8–15.
- Holway, D. A. (1998). Loss of intraspecific aggression in the success of a widespread invasive social insect. *Science*, *282*(5390), 949–952.
- Keller, L., & Passera, L. (1989). Influence of the number of queens on nestmate recognition and attractiveness of queens to workers in the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis* (Mayr). *Animal Behaviour*, *37*, 733–740.

- Langen, T. A., Tripet, F., & Nonacs, P. (2000). The red and the black: habituation and the dear-enemy phenomenon in two desert Pheidole ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *48*(4), 285–292.
- Levings, S. C., & Franks, N. R. (1982). Patterns of nested dispersion in a tropical ground ant community. *Ecology*, *63*(2), 338–344.
- Martin, S. J., Helanterä, H., Kiss, K., Lee, Y. R., & Drijfhout, F. P. (2009). Polygyny reduces rather than increases nestmate discrimination cue diversity in *Formica exsecta* ants. *Insectes Sociaux*, *56*(4), 375–383.
- Martin, S. J., Vitikainen, E., Drijfhout, F. P., & Jackson, D. (2012). Conspecific ant aggression is correlated with chemical distance, but not with genetic or spatial distance. *Behavior Genetics*, *42*(2), 323–331.
- Martin, S. J., Vitikainen, E., Helantera, H., & Drijfhout, F. P. (2008). Chemical basis of nestmate discrimination in the ant *Formica exsecta*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *275*(1640), 1271–1278.
- Meunier, J., Reber, A., & Chapuisat, M. (2011). Queen acceptance in a socially polymorphic ant. *Animal Behaviour*, *81*(1), 163–168.
- Morel, L., Meer, R. K. V., & Lofgren, C. S. (1990). Comparison of nestmate recognition between monogyne and polygyne populations of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *83*(3), 642–647.
- Newey, P. S., Robson, S. K. A., & Crozier, R. H. (2010). Weaver ants *Oecophylla smaragdina* encounter nasty neighbors rather than dear enemies. *Ecology*, *91*(8), 2366–2372.
- Oliveira, P. S., Camargo, R. X., & Fourcassié, V. (2011). Nesting patterns, ecological correlates of polygyny and social organization in the neotropical arboreal ant *Odontomachus hastatus* (Formicidae, Ponerinae). *Insectes Sociaux*, *58*(2), 207–217.
- R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

- Rosset, H., Schwander, T., & Chapuisat, M. (2007). Nestmate recognition and levels of aggression are not altered by changes in genetic diversity in a socially polymorphic ant. *Animal Behaviour*, 74(4), 951–956.
- Roulston, T. H., Buczkowski, G., & Silverman, J. (2003). Nestmate discrimination in ants: effect of bioassay on aggressive behavior. *Insectes Sociaux*, 50(2), 151–159.
- Sarthou, C., & Villiers, J.-F. (1998). Epilithic plant communities on inselbergs in French Guiana. *Journal of Vegetation Science*, 9(6), 847–860.
- Schaeffer-Novelli, Y., de Souza Lima Mesquita, H., Cintrón-Molero, G., & Cintron-Molero, G. (1990). The Cananéia lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Estuaries*, 13(2), 193–203.
- Seppä, P., & Pamilo, P. (1995). Gene flow and population viscosity in *Myrmica* ants. *Heredity*, 74(2), 200–209.
- Starks, P. T., Watson, R. E., Dipaola, M. J., & Dipaola, C. P. (2010). The effect of queen number on nestmate discrimination in the facultatively polygynous ant *Pseudomyrmex pallidus* (Hymenoptera: Formicidae). *Ethology*, 104(7), 573–584.
- Sundström, L. (1997). Queen acceptance and nestmate recognition in monogyne and polygyne colonies of the ant *Formica truncorum*. *Animal Behaviour*, 53(3), 499–510.
- Temeles, E. J. (1994). The role of neighbours in territorial systems: when are they “dear enemies”? *Animal Behaviour*, 47(2), 339–350.



# CHAPITRE 2

## **RÉSUMÉ**

Chez les fourmis, la reconnaissance coloniale repose largement sur la perception des hydrocarbures cuticulaires. Dans le chapitre précédent, nous avons caractérisé l'influence de la distance chimique entre colonies de populations identiques ou différentes sur les niveaux d'agressivité. Dans ce chapitre, nous caractérisons la variation au sein d'une colonie et entre colonies d'une population monogyne de Guyane. Notre analyse statistique révèle d'importantes variations dans les différentes classes structurales d'hydrocarbures cuticulaires entre colonies. En particulier, la proportion d'alcane linéaires varie fortement entre les colonies ce qui suggère leur implication potentielle dans la reconnaissance coloniale bien que cette classe de composés n'est généralement pas considérée comme pouvant signaler l'appartenance coloniale. En outre, notre étude a montré la présence d'une fraction importante de méthyle-alcènes (30% du profil en hydrocarbures) qui sont des composés rarement décrits chez les fourmis.



**Cuticular chemistry of *Odontomachus hastatus* : a study of a monogynous population from French Guiana**

Kévin BERTHELOT<sup>1</sup>, Felipe RAMON PORTUGAL<sup>2</sup> and Raphaël JEANSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse; CNRS, UPS, France

<sup>2</sup>ENFA - Evolution et Diversité Biologique, Université de Toulouse; CNRS, UPS, France

## **ABSTRACT**

Nestmate recognition in ants involves cuticular hydrocarbons. In the ant *O. hastatus*, we used a statistical approach to determine which structural classes of cuticular hydrocarbons can potentially be involved in nestmate discrimination. Our results indicated that alkanes, alkenes and alkadienes show substantial variations between colonies. Our analysis also revealed that the cuticular profiles comprise several methyl-alkenes, which are generally rare in ants.

## INTRODUCTION

In ants, communication heavily relies on chemical signals, in particular on cuticular profiles (Blomquist and Bagnères 2010). Cuticular hydrocarbons generally comprise a mixture of hydrocarbons that can be divided into three main structural classes including *n*-alkanes, methyl-branched compounds and unsaturated components (Blomquist 2010). Several models have been proposed to explain nestmate recognition and they posit that the range of variation in the cuticular profiles between colonies exceeds the range of variation between colonies (van Zweden and d'Ettorre 2010, Sturgis and Gordon 2012). Within colonies, the composition of cuticular lipids also shows variations between reproductive castes and task groups (Wagner et al. 2001, Monnin 2006, Sturgis and Gordon 2012). Although several studies demonstrated that hydrocarbons are involved in nestmate recognition, relatively fewer work attempted to identify which structural classes of hydrocarbons are involved. In the ant *Formica exsecta*, Martin et al. (2008) elegantly demonstrated that only the (Z9) alkene fraction of the profiles encodes nestmate recognition and that the alkane part plays no role in this phenomenon. In contrast, Lucas et al. (2005) suggested that internally branched methyl-alkanes are involved in recognition in the ant *Pachycondyla villosa*.

In Chapter 1, we were interested in differences in the cuticular profiles of *Odontomachus hastatus* at the population level but we did not consider the range of variations in chemical profiles within and between colonies within a population. Here, we focused on a single population in French Guiana, distinct from populations studied in Chapter 1. We used statistical analysis, not bioassays, to identify structural classes of hydrocarbons that might potentially be involved in nestmate recognition in *O. hastatus*.

## MATERIALS & METHODS

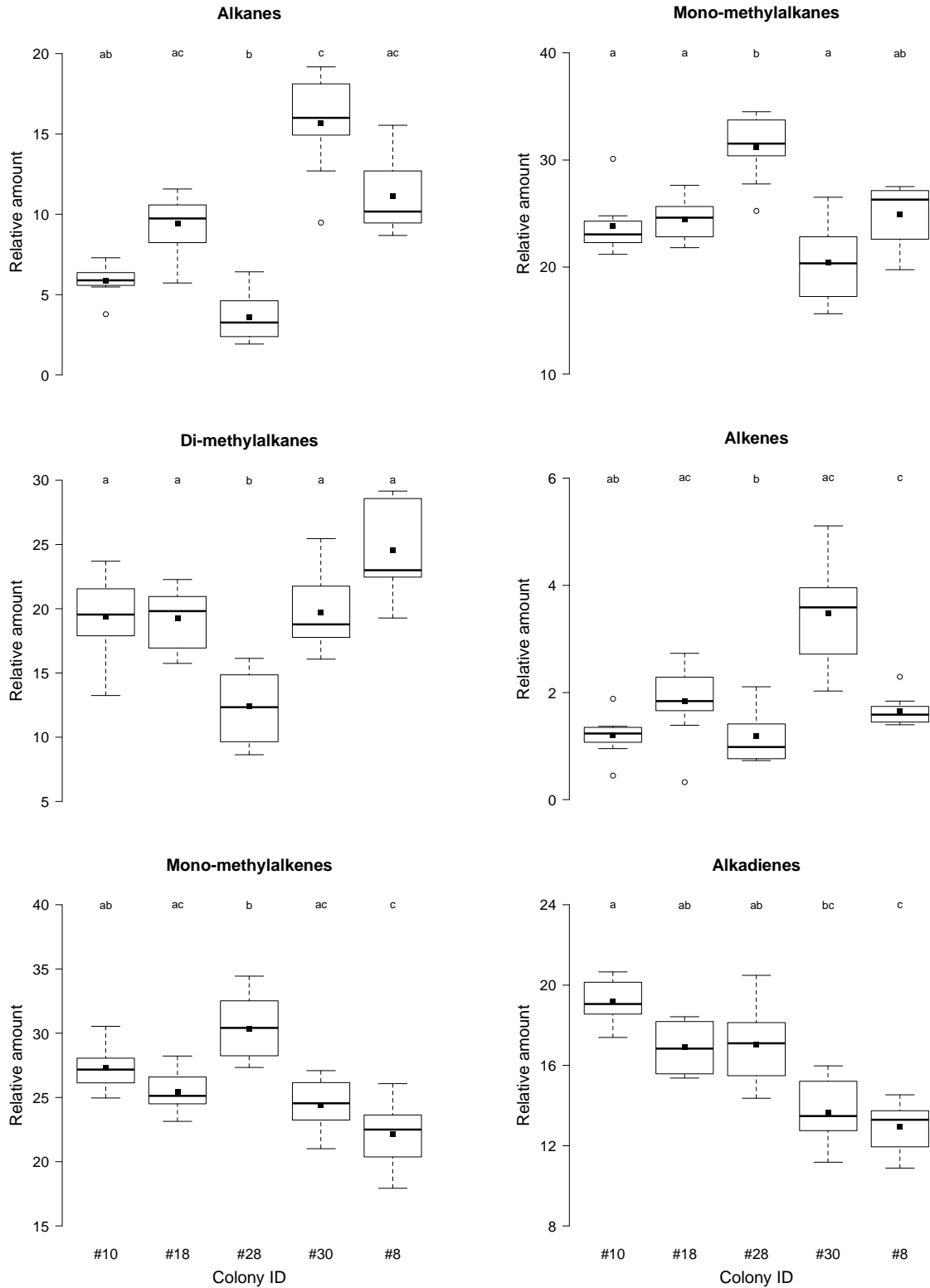
In French Guiana, colonies of *O. hastatus* typically nest in root clusters of epiphytic plants (*Asplenium*, *Cyclanthus*, *Philodendron*), in leaf litter accumulated in palm trees (*Geonoma*, *Astrocaryum*, *Bactris*) or in structures built on branches or lianas and the average volume of nests is about 8 liters (unpublished data). We collected 10 workers in 5 mature colonies at Maman Lézard (5°06'N, 52°99'W) during a fieldwork in French Guiana in March 2015. The nests were shaken to elicit the exit of several workers and to ensure that we did not collect only foragers. The average distance between colonies was 65 m (min=17 m, max=119 m). This site is distant of about 120 km from the field site of the Nouragues studied in the previous chapter. Each worker was individually introduced into a 2ml auto sampler vial and

soaked in 0.5 ml of pentane (Merck®, Darmstadt, Germany) for 10 minutes. The extract was transferred to another 2ml autosampler vial and evaporated under nitrogen stream. The dry residue was re-dissolved in 50 µl of hexane and stored at -18°C until the beginning of the chemical analysis. GC-MS analysis was performed on a mass spectrometer ISQ™QD Single Quadrupole GC-MS System (Thermo Fisher Scientific Inc., Villebon sur Yvette, France), fitted with a capillary column (Restek RTX-5MS 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness, 5 % diphenyl and 95 % dimethylpolysiloxane) and a splitless injector (280°C). Ionization was by electron impact (70eV, source temperature: 250°C). Helium was the carrier gas (1,2 mL/min). The oven temperature was maintained at 70°C after sample injection (2 µl), then programmed at 20°C/min to 180°C, then 5°C/min to 320°C and held for 10 min. Samples were automatically injected using an autosampler AS300 (Thermo Fisher Scientific Inc., Villebon sur Yvette, France). For each GC sample, peak areas were calculated by manual integration using Xcalibur 2.2 SP1 48 software and were expressed as the percentage of the total peak area. In the analysis, we only considered cuticular compounds ≥ 1% of the whole profile in at least two samples. A total of 27 compounds were included in the analysis. Note that, at this stage, the identification of compounds is still preliminary. This might explain the existence of some discrepancies in the proportions of structural classes between the present and next chapters.

All analyses were performed with R 3.2.1 (R Development Core Team 2015). We compared the average relative abundance of cuticular hydrocarbons of each class (i.e. alkanes, mono-methylalkanes, di-methylalkanes, alkenes, mono-methylalkenes and alkadienes) between colonies with Kruskal-Wallis tests followed by post-hoc Dunns' test. The relative abundance of each compound was then transformed before statistical analysis using the log ratio transformation (Aitchison 1986) using the formula of  $Z_{i,j} = \ln[Y_{i,j}/g(Y_j)]$ , where  $Z_{i,j}$  is the transformed area of peak  $i$  for ant  $j$ ,  $g(Y_j)$  is the geometric mean area of all compounds of individual  $j$  and  $Y_{i,j}$  is the untransformed area of peak  $i$  for ant  $j$ . For each hydrocarbon, we calculated the diagnostic power (DP) by dividing the standard deviation among individuals by the pooled standard deviation within colonies (van Zweden and d'Ettorre 2010). Compounds with high DP scores are expected to be highly influential in caste segregation. We then used compounds with DP scores >2 to run a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLSDA) implemented in the package RVAideMemoire (Hervé 2014). We next performed a permutational significance test based on cross model validation using the function MVA.test implement in the package RVAideMemoire (n=999 permutations).

## RESULTS & DISCUSSION

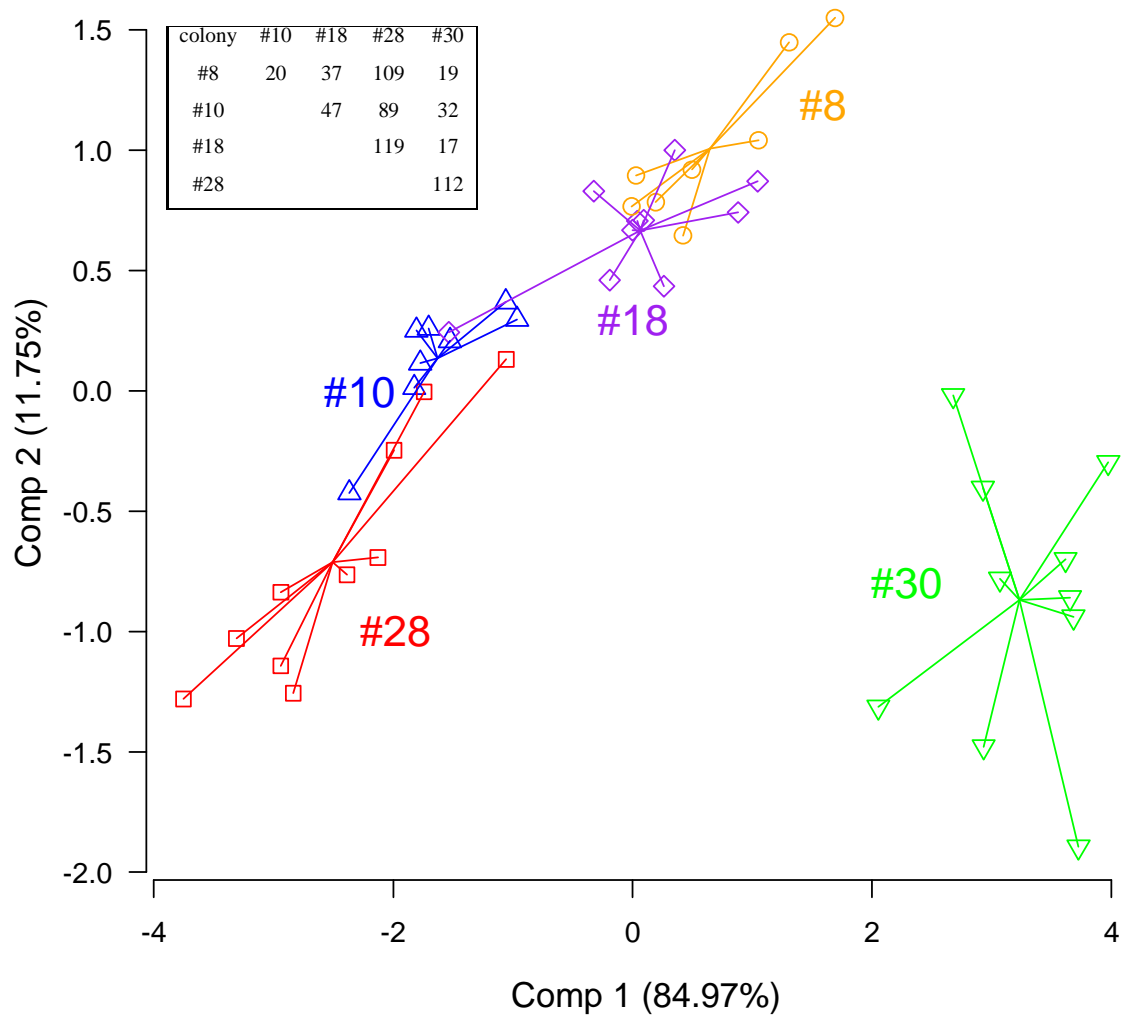
The cuticular profiles of workers of *O. hastatus* comprised 27 cuticular hydrocarbons ranging in chain length between C<sub>35</sub> to C<sub>44</sub> and included alkanes, mono-methylalkanes, di-methylalkanes, alkenes, mono-methylalkenes and alkadienes (Figure S1). The different classes of cuticular compounds showed variations between colonies (Figure 1).



**Figure 1.** Box plot of the relative amount of cuticular hydrocarbons of different classes (i.e. alkanes, mono-methylalkanes, di-methylalkanes, alkenes, mono-methylalkenes and alkadienes). The horizontal thick line and the square in each box represent the median and the mean, respectively. The box gives the interquartile range. Lower (or higher) whisker extends to the most extreme value within 1.5 interquartile ranges from the 1st (or 3rd) quartile. Circles indicate outliers. The black square in each

box represents the mean. Different letters indicate statistical differences (Kruskal-Wallis tests followed by post-hoc Dunn's test ( $P < 0.05$ )). Colony 10: N=7 workers; colony 18: N=10 workers; colony 28: N=10 workers; colony 30: N=10 workers; colony 8: N=8 workers.

We next performed a PLS-DA on the cuticular compounds with the highest values of Diagnostic Power (Table 1). Using the 7 cuticular compounds with values of the Diagnostic Power above 2, the discriminant analysis partly segregated individuals belonging to the five different colonies (error rate= 29%,  $P=0.001$ ) (Figure 2).



**Figure 2.** PLS-DA plot of the cuticular hydrocarbons with values of Diagnostic Power above 2 for workers of *O. hastatus* from five colonies collected at the Maman Lézard (French Guiana). Inset: Matrix of geographical distances (m) between colonies.

Identification	Class	RT	colony #10 (N=7)	colony #18 (N=10)	colony #28 (N=10)	colony #30 (N=10)	colony #8 (N=10)	DP
<b>Tetracontane</b>	<b>n-alkane</b>	<b>25.16</b>	<b>0.27 (0.16, 0.46)</b>	<b>0.29 (0.21, 0.41)</b>	<b>0.43 (0.3, 0.74)</b>	<b>2.75 (1.31, 4.01)</b>	<b>0.28 (0.17, 0.36)</b>	<b>2.89</b>
<b>Dotetracontane</b>	<b>n-alkane</b>	<b>28.05</b>	<b>5.57 (3.32, 7.04)</b>	<b>9.13 (5.31, 11.34)</b>	<b>3.18 (1.5, 6.12)</b>	<b>12.9 (7.42, 16.54)</b>	<b>10.84 (8.51, 15.18)</b>	<b>2.1</b>
			<i>total=5.84</i>	<i>total=9.42</i>	<i>total=3.61</i>	<i>total=15.65</i>	<i>total=11.12</i>	
13- and 11- Methylheptatriacontane	methyl alkane	21.48	5.67 (4.17, 8.36)	4.11 (3.2, 6.65)	7.67 (3.23, 12.3)	2.02 (1.25, 4.38)	3.87 (2.4, 5.05)	1.51
13-, 15- and 17- Methylnonatriacontane	methyl alkane	24.01	16.25 (14.94, 19.9)	16.94 (15.04, 19.23)	21.12 (18.86, 23.83)	13.7 (10.14, 18.42)	17.6 (13.83, 19.96)	1.63
13-, 15- and 17-Methylhentetracontane	methyl alkane	27.51	1.9 (1.65, 2.08) 23.82	3.41 (1.75, 3.9) 24.46	2.42 (1.52, 3.63) 31.21	4.73 (3.72, 6.02) 20.45	3.45 (2.16, 4.66) 24.92	1.8
13,x-Dimethylheptatriacontane	dimethyl alkane	21.78	1.37 (0.94, 1.89)	1 (0.62, 1.99)	1.36 (0.78, 2.34)	0.53 (0.39, 0.8)	0.96 (0.72, 1.18)	1.36
14,15-Dimethyloctatriacontane (or12- and 14-Methyloctatriacontane)	dimethyl alkane	22.61	0.85 (0.71, 1.18)	0.69 (0.57, 1.15)	1.11 (0.67, 1.43)	0.43 (0.32, 0.87)	0.65 (0.48, 0.8)	1.61
x,12-Dimethylnonatriacontane	dimethyl alkane	24.41	16.56 (10.58, 20.27)	16.79 (13.51, 19.31)	9.46 (5.52, 14.08)	16.41 (13.06, 21.81)	22.09 (17.01, 26.59)	1.71
<b>4,x- Dimethyl-dotetracontane</b>	<b>dimethyl alkane</b>	<b>29.14</b>	<b>0.2 (0.15, 0.28)</b>	<b>0.22 (0.12, 0.3)</b>	<b>0.22 (0.12, 0.31)</b>	<b>1.19 (0.34, 1.85)</b>	<b>0.24 (0.18, 0.32)</b>	<b>2</b>
<b>13,x-Dimethyltetracontane</b>	<b>dimethyl alkane</b>	<b>33.17</b>	<b>0.39 (0.28, 0.5)</b>	<b>0.6 (0.29, 0.89)</b>	<b>0.27 (0.11, 0.49)</b>	<b>1.15 (0.68, 1.52)</b>	<b>0.61 (0.46, 0.93)</b>	<b>2.15</b>
			<i>total=19.37</i>	<i>total=19.29</i>	<i>total=12.42</i>	<i>total=19.72</i>	<i>total=24.57</i>	
Tetratetracontene	n-alkene	30.94	1.2 (0.45, 1.88)	1.84 (0.33, 2.73)	1.19 (0.73, 2.1)	3.48 (2.03, 5.11)	1.65 (1.4, 2.29)	1.7
x-Methylnonatriacontene <sup>1</sup>	methyl alkene	23.22	9.2 (7.51, 11.13)	5.8 (4.76, 9.64)	10.15 (6.05, 14.62)	3.34 (2.28, 5.42)	4.56 (2.74, 5.67)	1.89
<b>x-Methylnonatriacontene<sup>2</sup></b>	<b>methyl alkene</b>	<b>23.4</b>	<b>3.44 (3.09, 3.69)</b>	<b>2.59 (2.09, 3.22)</b>	<b>4.65 (3.19, 6.47)</b>	<b>1.42 (1.04, 2.05)</b>	<b>2.6 (1.75, 3.29)</b>	<b>2.07</b>
x-Methyloctatriacontene	methyl alkene	23.64	0.57 (0.48, 0.65)	0.57 (0.44, 1.04)	0.66 (0.39, 0.92)	0.38 (0.27, 0.61)	0.53 (0.45, 0.69)	1.2
x-Methylnonatriacontene	methyl alkene	23.72	0.54 (0.41, 0.78)	0.59 (0.4, 1.45)	0.97 (0.42, 1.37)	0.29 (0.11, 0.82)	0.4 (0.26, 0.66)	1.34
x-Methyltetracontene	methyl alkene	24.65	0.6 (0.53, 0.7)	0.63 (0.41, 1.3)	0.75 (0.6, 0.86)	1.23 (0.69, 2.73)	0.57 (0.5, 0.69)	1.25
x-Methylhentetracontene	methyl alkene	26.42	5.97 (5.28, 8.57)	6.44 (2.45, 7.97)	5.65 (4.56, 6.92)	7.53 (4.89, 10.25)	5.47 (4.39, 6.98)	1.13
x-Methyl-dotetracontene	methyl alkene	26.71	0.48 (0.24, 1.1)	0.81 (0.24, 1.15)	0.58 (0.29, 0.97)	0.94 (0.39, 1.7)	0.67 (0.41, 1.19)	1.08
x-Methylhentetracontene <sup>1</sup>	methyl alkene	26.98	1.93 (1.67, 2.23)	2.08 (1.7, 2.38)	1.9 (1.36, 2.34)	2.2 (1.59, 2.82)	1.75 (1.44, 2.33)	1.1
x-Methylhentetracontene <sup>2</sup>	methyl alkene	27.15	2.83 (2.51, 3.26)	3.49 (1.82, 4.53)	3.53 (2.79, 4.26)	3.53 (2.83, 4.86)	3.33 (2.8, 4.01)	1.07
<b>x-Methyltetracontene</b>	<b>methyl alkene</b>	<b>31.68</b>	<b>1.21 (1.06, 1.41)</b>	<b>1.67 (0.97, 2.01)</b>	<b>0.98 (0.61, 1.71)</b>	<b>2.4 (2.2, 2.69)</b>	<b>1.54 (1.28, 1.92)</b>	<b>2.28</b>
unknown	methyl alkene	31.84	0.53 (0.25, 0.79) <i>total=27.29</i>	0.79 (0.37, 1.09) <i>total=25.47</i>	0.51 (0.35, 0.73) <i>total=30.33</i>	1.19 (1, 1.48) <i>total=24.44</i>	0.72 (0.53, 1.04) <i>total=22.14</i>	1.72
Nonatriacontadiene	n-alkadiene	23.01	2.09 (1.81, 2.49)	1.31 (0.94, 3.13)	1.47 (0.77, 2.13)	0.51 (0.35, 0.84)	1.03 (0.84, 1.29)	1.59
Hentetracontadiene <sup>1</sup>	n-alkadiene	25.98	1.61 (1.15, 1.97)	1.33 (0.98, 1.78)	1.68 (1.3, 2.12)	1.1 (0.66, 1.6)	1.08 (0.73, 1.22)	1.37
<b>Hentetracontadiene<sup>2</sup></b>	<b>n-alkadiene</b>	<b>26.19</b>	<b>10.67 (9.6, 11.66)</b>	<b>8.88 (7.91, 9.94)</b>	<b>9.16 (7.27, 12.07)</b>	<b>5.63 (4.57, 7.08)</b>	<b>6.38 (5.02, 7.4)</b>	<b>2.15</b>
Tetratetracontadiene <sup>1</sup>	n-alkadiene	30.31	1.35 (1.06, 1.75)	1.44 (1.16, 1.73)	1.37 (1, 1.69)	2.07 (1.6, 2.47)	1.36 (1.27, 1.48)	1.62
Tetratetracontadiene <sup>2</sup>	n-alkadiene	30.58	3.47 (2.41, 4.25) <i>total=19.19</i>	3.96 (2.33, 4.74) <i>total=16.92</i>	3.34 (2.56, 4.31) <i>total=17.02</i>	4.36 (3.67, 5.16) <i>total=13.67</i>	3.08 (2.73, 3.3) <i>total=12.92</i>	1.25

**Table 1.** Mean (minimum, maximum) relative abundance of cuticular compounds for each caste. Superscript numbers in first column indicate compounds differing in double bond position. ‘x’ indicate uncertain methyl group position. The positions of double bonds in alkenes and alkadienes and their stereochemistry are not known. DP: values of Diagnostic Power. Compounds highlighted in bold were retained for discriminant analysis (PLS-DA).RT: Retention Time (minutes).



Our analysis revealed substantial variations in the fraction of different structural classes of hydrocarbons between colonies (Figure 1). We found one alkadiene (hentracontadiene), two methylalkanes (4,x-dimethyldotetracontane; 13, x-dimethyltetratetracontane) and one methylalkene (x-methyltetracontene) among the hydrocarbons with the highest diagnostic power. Branched and unsaturated compounds are considered to be good candidates for nestmate recognition because their structure offers the potential to generate a diversity of combinations that are useful for discrimination (Martin et al. 2009b). We also found that two linear alkanes (tetracontane and dodetetracontane) were highly variable between colonies and that one alkane (tetracontane) was the hydrocarbon with the highest score of diagnostic power. It could be argued that workers collection in the field might have been biased toward foragers in some colonies and that this could explain the range of variations between colonies in their relative abundance of alkanes. We cannot exclude this hypothesis but we vigorously shook colonies to ensure that we collect a representative set of workers including foragers and non-foragers. The difference in the fraction of alkanes between colonies might provide indirect lines of evidence that they participate to nestmate recognition in *O. hastatus*. On the one hand however, the traditional view is that linear alkanes are unlikely to be involved in nestmate recognition. Indeed, these hydrocarbons are believed to primarily prevent individuals from water loss notably and their quantities vary with environmental factors (Martin and Drijhout 2009a, Wagner et al. 2001). As things stand now, n-alkanes are considered to advertise task specialization such as foraging (Greene and Gordon 2003, Martin and Drijhout 2009b). On the other hand, we reported previously (see Chapter 1) the existence of important differences in the relative abundance of linear alkanes between colonies collected in Brazil and French Guiana. Interestingly, dyadic encounters between workers from Brazil and French Guiana showed the highest scores of aggression. Evidently, the putative role of alkanes in nestmate recognition awaits empirical investigation and we are planning in a near future to manipulate the cuticular profiles of workers by adding synthetic n-alkanes to test explicitly this assumption.

In ants, branched alkenes are very rare and they have been reported in a very few species (Martin and Drijhout 2009b). In the primitive ant *Nothomyrmecia macrops*, about 65% of the hydrocarbons profiles are branched alkenes (Brown et al. 1990) and this fraction can rise up to 98% in the ant *Camponotus rufifemur* (Menzel et al. 2008). The average cuticular profile of workers in *O. hastatus* comprises 11 methyl-alkenes, which correspond approximately to 25-30% of hydrocarbons. We detected no difference in the fraction of methyl-alkenes

between colonies but, interestingly, one methyl-alkene (x-methyltetracontene) had the second highest score of Diagnostic Power. In a comparative study of fertility signals of three species of *Odontomachus* (*O. ruginodis*, *O. relictus*, *O. haematodus*), Smith et al. (2016) did not detect any branched alkenes in cuticular profiles. Both in *N. macrops* and *C. rufifemur*, methylalkenes occurred at chain length greater than 33 carbons. Similarly, the profile of *O. hastatus* comprises long chain hydrocarbons (>C33) while other *Odontomachus* species have shorter cuticular compounds (<C33) (Smith et al. 2016). One can speculate that a critical length chain might be required to allow the synthesis of methylalkenes (see also Martin et al. 2009b). In any case, to our knowledge, the putative function of this structural class is not known and not discussed in the literature.

In conclusion, this study provided a description of the variation in cuticular profiles between colonies of *O. hastatus*. Using a statistical approach, we identified some candidate molecules that could be involved in nestmate recognition. The existence of relatively tolerant behaviours during pairwise encounters despite distinct cuticular profiles between colonies and populations (Chapter 1), the presence of long chain hydrocarbons and the existence of rare compounds make *O. hastatus* an intriguing and interesting model that clearly deserves further empirical attention.

## REFERENCES

- Aitchison, J. (1986). *The Statistical Analysis of Compositional Data*. London: Chapman and Hall.
- Blomquist, G. J. (2010). Structure and analysis of insects hydrocarbons. In *Insects Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. (G. J. Blomquist & A.-G. Bagnères, Eds.). Cambridge: Cambridge University Press. (pp. 19–35).
- Brown, W. V., Jaisson, P., Taylor, R. W., & Lacey, M. J. (1990). Novel internally branched, internal alkenes as major components of the cuticular hydrocarbons of the primitive Australian ant *Nothomyrmecia macrops* Clark (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, *16*(9), 2623–2635.
- Greene, M. J., & Gordon, D. M. (2003). Social insects: Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature*, *423*(6935), 32–32.
- Hervé, M. (2014). RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions. URL: <http://cran.r-project.org/package=RVAideMemoire>.
- Lucas, C., Pho, D. B., Jallon, J. M., & Fresneau, D. (2005). Role of cuticular hydrocarbons in the chemical recognition between ant species in the *Pachycondyla villosa* species complex. *Journal of Insect Physiology*, *51*(10), 1148–1157.
- Martin, S. J., & Drijfhout, F. P. (2009). Nestmate and task cues are influenced and encoded differently within ant cuticular hydrocarbon profiles. *Journal of Chemical Ecology*, *35*(3), 368–374.
- Martin, S. J., Vitikainen, E., Helanterä, H., & Drijfhout, F. P. (2008). Chemical basis of nestmate discrimination in the ant *Formica exsecta*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *275*(1640), 1271–1278.
- Martin, S., & Drijfhout, F. (2009). A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. *Journal of Chemical Ecology*, *35*(10), 1151–1161.
- Menzel, F., Blüthgen, N., & Schmitt, T. (2008). Tropical parabiotic ants: Highly unusual cuticular substances and low interspecific discrimination. *Frontiers in Zoology*, *5*(1), 16.

- Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Annales Zoologici Fennici*, 43(5–6), 515–530.
- R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Smith, A. A., Millar, J. G., & Suarez, A. V. (2016). Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* trap-jaw ants. *Journal of Experimental Biology*, 219(3), 419–430.
- Sturgis, S. J., & Gordon, D. M. (2012). Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): A review. *Myrmecological News*, 16(January), 101–110.
- van Zweden, J. S., & D’Ettorre, P. (2010). Nestmate recognition in ants. In *Insects Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. (G. J. Blomquist & A.-G. Bagnères, Eds.). Cambridge: Cambridge University Press. (pp. 222–244).
- Wagner, D., Tissot, M., & Gordon, D. (2001). Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *Journal of Chemical Ecology*, 27(9), 1805–1819.

# CHAPITRE 3

## RÉSUMÉ

La fermeture coloniale constitue une caractéristique importante des sociétés d'insectes eusociaux permettant aux colonies de préserver leur intégrité génétique en reconnaissant et évitant les individus non apparentés. Il est prédit que les individus résidents modulent leur réponse comportementale en fonction du potentiel reproducteur des intrus. Chez les espèces monogynes, le maintien de la structure sociale nécessite d'expulser tout individu potentiellement reproducteur, notamment de jeunes reines cherchant à établir leur colonie.

L'objectif du présent chapitre est d'étudier les mécanismes comportementaux et les modalités de communication impliqués dans la reconnaissance et l'acceptation d'individus conspécifiques non apparentés par les ouvrières de colonies monogynes chez *O. hastatus*. Nous avons réalisé des expériences d'introduction, sur le terrain et en laboratoire, afin de caractériser la réaction des ouvrières lors de la présentation d'individus étrangers issus de castes différentes et possédant divers degrés de fertilité. Au laboratoire, nous avons également étudié l'influence relative du comportement et des indices chimiques fournis par les hydrocarbures cuticulaires sur la réaction comportementale des individus. Nos résultats montrent que les ouvrières de colonies matures monogynes modulent l'intensité de leur agressivité vis-à-vis des individus introduits en fonction de la caste et du statut de fertilité de ces derniers. Les reines fondatrices sont violemment attaquées tandis que les reines matures étrangères ne sont jamais récipiendaires d'actes agonistiques. En introduisant des individus vigiles ou anesthésiés, nous montrons que la réaction comportementale des individus résidents semble déclenchée majoritairement par des indices chimiques et que le comportement des individus introduits ne joue qu'un rôle marginal. En outre, nos résultats indiquent que la variabilité dans la réponse comportementale est moindre lors de confrontations avec des reines matures ou des reines fondatrices. L'analyse des profils en hydrocarbures cuticulaires révèle l'existence d'une signature chimique caractéristique de la caste. Cette étude confirme que les ouvrières pourraient reconnaître chaque caste par sa signature chimique et ainsi diriger spécifiquement leur agressivité vers les reines fondatrices qui menacent l'intégrité génétique de leur nid.

**Article 1:**

**Caste discrimination in ants: what role for behavioral and chemical cues?**

Kévin BERTHELOT<sup>1</sup>, Felipe RAMON PORTUGAL<sup>2</sup> and Raphaël JEANSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

<sup>2</sup>ENFA - Evolution et Diversité Biologique, Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

## ABSTRACT

In social insects, the maintenance of genetic colony integrity requires resident workers to recognize any intruder with a reproductive potential and to behave appropriately to minimize fitness costs. In this study, our objective was to identify the relative contribution of the behavioral patterns and chemical cues of intruders with different fertility status on their likelihood of being accepted in monogynous colonies. Using the ponerine ant *Odontomachus hastatus* as a model organism, we introduced non-nestmate workers, founding queens and heterospecific workers on intact nests in the field. We demonstrated that resident workers were more aggressive toward founding queens than toward non-nestmates workers originating from the same or a distant population. Lab experiments showed that the patterns of aggression did not differ substantially between chilled and live ants, which suggests that chemical cues alone allow caste discrimination. However, the absence of behavioral cues produced more variable results in the outcome of interactions. We also showed that resident workers readily accepted non-nestmate mature queens. The analysis of cuticular profiles revealed that individuals belonging to different castes and fertility status have contrasted chemical signatures. Overall, our study revealed that workers exhibit a graded behavioral response depending on the reproductive status of intruders. We discussed the observed variation in the extent of aggression in relation to the potential fitness costs associated with acceptance or rejection error of individuals differing in fertility status.

**Keywords:** aggressiveness, ant, caste, cuticular hydrocarbons, fertility, monogyny.



## INTRODUCTION

In insect societies, worker aggression allows colonies to prevent the intrusion of undesirable individuals, being they conspecifics or heterospecifics. The necessity to recognize intruders is strengthened when colonies face reproductive individuals that can have negative effects on the fitness of colony members by depressing intra-nest genetic relatedness (Heinze and Keller 2000). Workers of resident colonies are thus expected to display the highest level of aggression toward individuals with a reproductive potential that could jeopardize the fitness of colony members.

In ants, most studies that investigated nestmate recognition focused on interactions between individuals from the worker caste and it is generally admitted that nestmate recognition involves a comparison between the chemical profile of an intruder and the internal representation of an individual's own odour, any mismatch leading to rejection (Sturgis and Gordon 2012). Earlier work also examined, albeit to a lesser extent, how workers in established colonies react to the presence of additional reproductives differing in their fertility status (young vs. mature queens) and relatedness to resident colony workers (Fortelius et al. 1993, Stuart et al. 1993, Evans 1996, Sundström 1997, Vander Meer and Porter 2001, Kikuchi et al. 2007, Cournault and de Biseau 2009, Souza et al. 2005, Holzer et al. 2008, Zinck et al. 2009, Moore and Liebig 2010, Meunier et al. 2011, Chernenko et al. 2012, Bernadou et al. 2015). These studies reported contrasting results on the rate of acceptance of additional queens that likely rely on differences in social structures. Indeed, the authors generally deployed a comparative approach between monogynous (i.e. one queen) and polygynous (i.e. several queens) colonies belonging to socially polymorphic species or facultative polygynous populations. In *F. truncorum* for instance, workers from monogynous colonies are about three times more aggressive toward young queens than workers from polygynous colonies (Sundström 1997). This contrasts with *F. selysi* where workers from monogynous and polygynous colonies showed similar level of acceptance of non-nestmate young females (Meunier et al. 2011). A single study so far examined how a monogynous species react to the intrusion of reproductives with different fertility status and provided evidence that workers similarly attack non-nestmate workers and low fertility queens but readily accept unrelated mature queens (Moore and Liebig 2010).

Cuticular hydrocarbons in social insects encode a variety of information used in a social context to discriminate nestmates and non-nestmates or to recognize castes (Blomquist and Bagnères 2010, Sturgis and Gordon 2012). The perception of the chemical signature of

reproductive females plays a key role in the response of colony members toward intruders and a wealth of experimental studies demonstrated that the status of fertility of individuals are encoded in their cuticular profiles (Monnin 2006, Liebig 2010). However, the motor display of intruders could provide additional cues that could also participate to the discrimination of reproductives differing in fertility. Indeed, earlier work showed that maturation in reproductive females is accompanied by important changes in their geotactic, phototactic and locomotor behaviors (Lone et al. 2012, Bernadou and Heinze 2013).

In this context, we combined fieldwork and laboratory experiments to disentangle the relative influence of the behavioral and chemical cues of intruders on the response of resident workers and to determine whether resident workers modulated their response depending on the castes and fertility status of intruders. We worked on *Odontomachus hastatus* (Fabricius), which is an arboreal and nocturnal ponerine ant species living in tropical rainforests of Central and South America (Camargo and Oliveira 2012). In this species, queens (head size  $\approx$  1.8 mm) are larger than workers (head size  $\approx$  1.5 mm) and the average colony size is about 200 workers. The presence of winged females in mature colonies suggests the existence of mating flights. We studied populations from French Guiana where all queenright nests collected over years ( $>200$ , unpublished data) contained a single queen (note that facultative polygyny has been reported in southeast Brazil, pers. obs., Oliveira et al. 2011). We collected intact nests on which we deposited nestmate or non-nestmate workers, founding queens (i.e. young queens with eggs but no worker) and heterospecific workers. Under the assumption that resident workers actively contribute to the maintenance of colony genetic structure, we predicted that foundresses would be recipient of the highest level of aggression. Because the reaction towards intruders could depend on their behavioral patterns and cuticular signatures, we confronted in the laboratory resident workers to live or chilled ants of different castes and fertility status, including mature queens, to identify the relative contribution of behavioral and chemical cues on their response (Gamboa et al. 1991). If cuticular cues were sufficient for caste discrimination, we predicted live and chilled intruders to be recipient of similar patterns of aggression. In parallel, we characterized the cuticular profiles of individuals using gas chromatography coupled with mass spectrometry. If the level of aggression experienced by individuals depended on their castes and fertility status, we expected a strong chemical caste-signature that would limit recognition errors and allow workers to display an unambiguous response toward intruders.

## MATERIALS & METHODS

### *Collection sites*

In French Guiana, colonies of *O. hastatus* typically nest in root clusters of epiphytic plants (*Asplenium*, *Cyclanthus*, *Philodendron*), in leaf litter accumulated in palm trees (*Geonoma*, *Astrocaryum*, *Bactris*) or in structures built on branches or lianas and the average volume of nests is about 8 liters (unpublished data). Founding queens are found in moss on tree bark or at the basis of epiphytic plants. We studied two populations distant of approximately 80 km (Grand Laussat: 5°42'N, 53°61'W and Maman Lézard: 5°06'N, 52°99'W). The spatial coordinates of all nests and foundations were recorded using a GPS (Garmin GPSmap 60CSx).

### *Interactions on intact nests*

We first aimed at testing the response of established colonies to intruders of different castes. In 2014, we collected 26 foundresses (i.e. female with brood but no worker) and 10 intact mature nests from each population. During nest collection, we took special care to preserve nest structure. The whole nests were maintained in a large dark plastic bag (volume: 150 liters) until the beginning of the experiments and a maximum of 24 hours elapsed between nest collection and behavioral tests. Experiments were performed in the field station to facilitate observation and recording of interactions and also because we tested the response toward intruders from both populations on each nest (see below). The size of resident colonies (assessed upon completion of behavioral tests) did not differ between nests from each population (mean  $\pm$  SD: 111  $\pm$  65 workers vs. mean  $\pm$  SD: 165  $\pm$  70 workers) ( $t$ -test:  $t_{18}=1.82$ ,  $P=0.09$ ).

Each trial consisted in the introduction of one ant on the nest surface of a resident colony. Before the beginning of a trial we hanged the nest with a rope and we marked the ants to be introduced with a dot of paint on the back of the head. After one hour of acclimation, we gently introduced on each nest, sequentially and in random order, one ant of the following five categories:

- a nestmate worker (n=20),
- a foundress from the same population (n=20),
- a non-nestmate worker from the same population (hereafter, intra-site non-nestmate) (n=20),

- a non-nestmate worker from the other population (hereafter, inter-site non-nestmate) (n=20),
- a worker from a different species (hereafter, heterospecific worker) (n=20). We used the sympatric ant species *Odontomachus mayi* because it shares the same behavioral repertoire than *O. hastatus*, which allows relevant comparisons between inter vs. intra specific encounters.

We used ants only once. We waited than resident workers calmed down and reentered the nest before presenting the next intruder. Ants were filmed for 5 minutes with Sony Handycam Full HD 7.1 megapixels. The following interactions of increasing aggression were scored: ignore or antennation (score 1), holding (grasp and transport of an individual without any attempt to sting, score 2) (Movie 1, Electronic Supplementary Materials), mandibular strike (forward lunge accompanied by a fast closing of mandibles, score 3) and stinging (score 4) (Movie 2, Electronic Supplementary Materials). If no interaction occurred during the first 5 minutes (14% of trials), ants were left on the nest for 5 additional minutes. The highest level of aggression observed gave the score of interaction. Because intruders differed in size and morphology, blinded methods were not used to score interactions. Ants that entered the nest (2 nestmates, 2 intra-site non-nestmates, 2 foundresses) or that did not interact (2 heterospecific workers, 2 foundresses, 1 intra-site non-nestmate, 3 inter-site non-nestmate) were discarded from the analysis.

#### *Dyadic encounters in the laboratory*

This experiment aimed at assessing the respective contribution of chemical and behavioral cues emitted by the intruders on the response of resident workers. In 2015, we collected 38 founding queens and 19 queenright colonies from the same populations than in 2014. In the lab, foundresses and colonies were housed in plastic boxes (17 x 12 x 6.5 cm) containing a layer of dirt and paper towels at 25°C and 60-70% RH and they were fed three times a week with ant diet (Bhatkar and Whitcomb 1970). Circular pieces of filter papers (diameter: 5.5 cm) were placed in the nests for 24 h before the beginning of behavioral trials. We conducted dyadic encounters to assess aggression between one resident worker and one intruder. Encounters with a single worker were performed because only one individual generally interacted with intruders on intact nests. Encounters were performed in a circular plastic arena (diameter: 5.5 cm, height: 1.7 cm) covered by a transparent plastic lid to prevent ants

from escaping. The arena was grounded with a piece of filter paper marked by nestmates of the resident worker. The resident worker was introduced in the arena for acclimation during 5 minutes. In the meantime, the intruder was chilled by placing it at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 minutes and then on ice for 3 minutes. Live intruders were not exposed to cold and were maintained in a plastic vial for 5 minutes prior their introduction in the arena. The intruder was gently deposited in the center of the arena through a small hole drilled in the lid of the arena. Interactions were recorded using a camera (Sony Handycam Full HD 7.1 megapixels) placed above the arena. Because cooled ants woke up rapidly, we only considered the first minute of each encounter. During field experiments, intruders could escape and several minutes were sometimes required to observe interactions with resident workers. In the lab, one-minute test was sufficient to assess aggression scores because the small size of the arena prevented intruder's flight and forced interactions. Resident workers and intruders were used only once each and the order of dyads tested was determined randomly. Dyadic encounters in the lab were conducted two months after fieldwork.

We tested the response to the introduction of a nestmate worker, a foundress and a non-nestmate worker from the other population and a worker from a different but sympatric species (*Odontomachus haematodus*). In the field, it was not possible to test the reaction of resident to the introduction of mature queens because collecting queens would have required us to destroy their nests. In the lab however, colonies were maintained in artificial nests and it was possible to isolate queens. Therefore, we tested how resident workers reacted to the introduction of a non-nestmate queen from a mature colony from the other population. The age of mature queens was unknown. We used the same scale than described above to score aggression. In total, 9 to 17 replicates were performed for each condition.

#### *Chemical analysis*

A SPME fibre (100  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxane; Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) was gently rubbed on the gaster for 2 min and then thermally desorbed for 5 min in the injection port of a mass spectrometer ISQ<sup>TM</sup>QD Single Quadrupole GC-MS System (Thermo Fisher Scientific Inc., Villebon sur Yvette, France), fitted with a capillary column (Restek RTX-5MS 30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, 5 % diphenyl and 95 % dimethylpolysiloxane) and a splitless injector ( $280^{\circ}\text{C}$ ). Ionization was by electron impact (70eV, source temperature:  $250^{\circ}\text{C}$ ). Helium was the carrier gas (1,2 mL/min). The oven temperature was maintained at  $70^{\circ}\text{C}$  after sample injection (2  $\mu\text{l}$ ), then programmed at

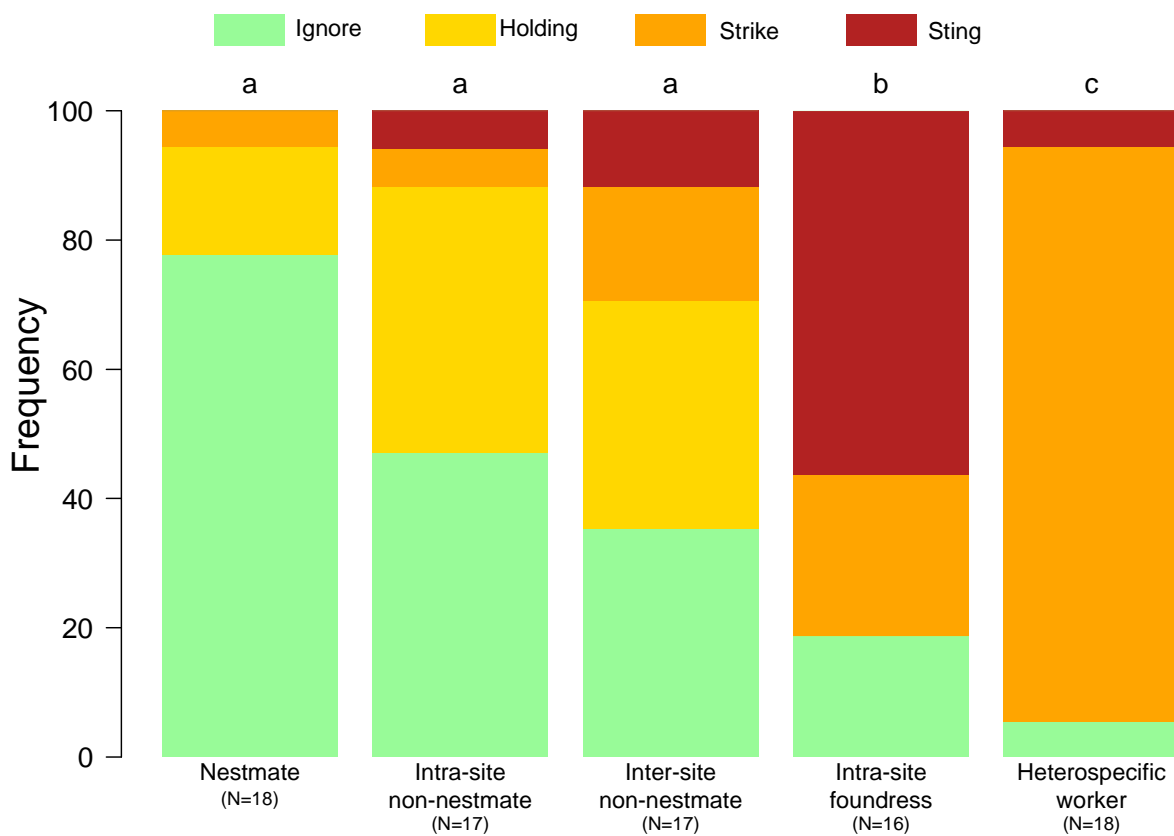
20°C/min to 180°C, then 5°C/min to 320°C and held for 10 min. For each GC sample, peak areas were calculated by manual integration using Xcalibur 2.2 SP1 48 software and were expressed as the percentage of the total peak area. Hydrocarbons were identified by their mass spectra and their retention indices. The relative abundance of each compound was transformed before analysis using the log ratio transformation after adding a constant value of 0.001 to each relative peak area (Aitchison 1986). We characterized the cuticular profiles of individuals one month after the completion of fieldwork. By analogy with an earlier study comparing cuticular profiles between castes in several species of *Odontomachus*, we included in the analysis compounds present in >70% of individuals in either caste (foundresses, queens, workers) (Table 1) (Smith et al. 2016). In total, we analyzed the profiles of 12 workers (one worker per colony, 8 colonies from Grand Laussat and 4 Maman Lézard, respectively), 25 foundresses (8 from Grand Laussat and 17 from Maman Lézard, respectively) and 14 queens (11 from Grand Laussat and 3 from Maman Lézard, respectively) that were used in the experiments described above.

#### *Statistical analysis*

All analyses were performed with R 3.2.1 (R Development Core Team 2015). For field and lab experiments, we compared the frequencies of each score of aggression between the different categories of intruders using Fisher's exact tests. We corrected *P*-values for multiple comparisons using Benjamini and Hochberg correction (both non-adjusted and adjusted *P*-values are reported in Appendix 1). Fisher's exact tests were also used to compare aggression scores between live and chilled individuals (the relatively low sample size and the structure of datasets precluded the use of statistical tests to deal with the issue of pseudo replication that could arise from the repeated use of resident colonies). We ran a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLSDA) (Barker and Rayens 2003) implemented in the package RVAideMemoire (Hervé 2014) to determine whether workers, foundresses and mature queens could be separated on the basis of their cuticular profiles. We assessed statistical significance by performing a permutational test (n=999 permutations) based on M-fold cross validation using the function MVA.test implemented in the package RVAideMemoire. An error rate (%) was calculated to determine the accuracy of discrimination by averaging the number of misclassifications (NMC) from each of the M steps of the cross-validation. A similar approach was used in workers to determine whether the cuticular profiles workers segregated between the two populations.

## RESULTS

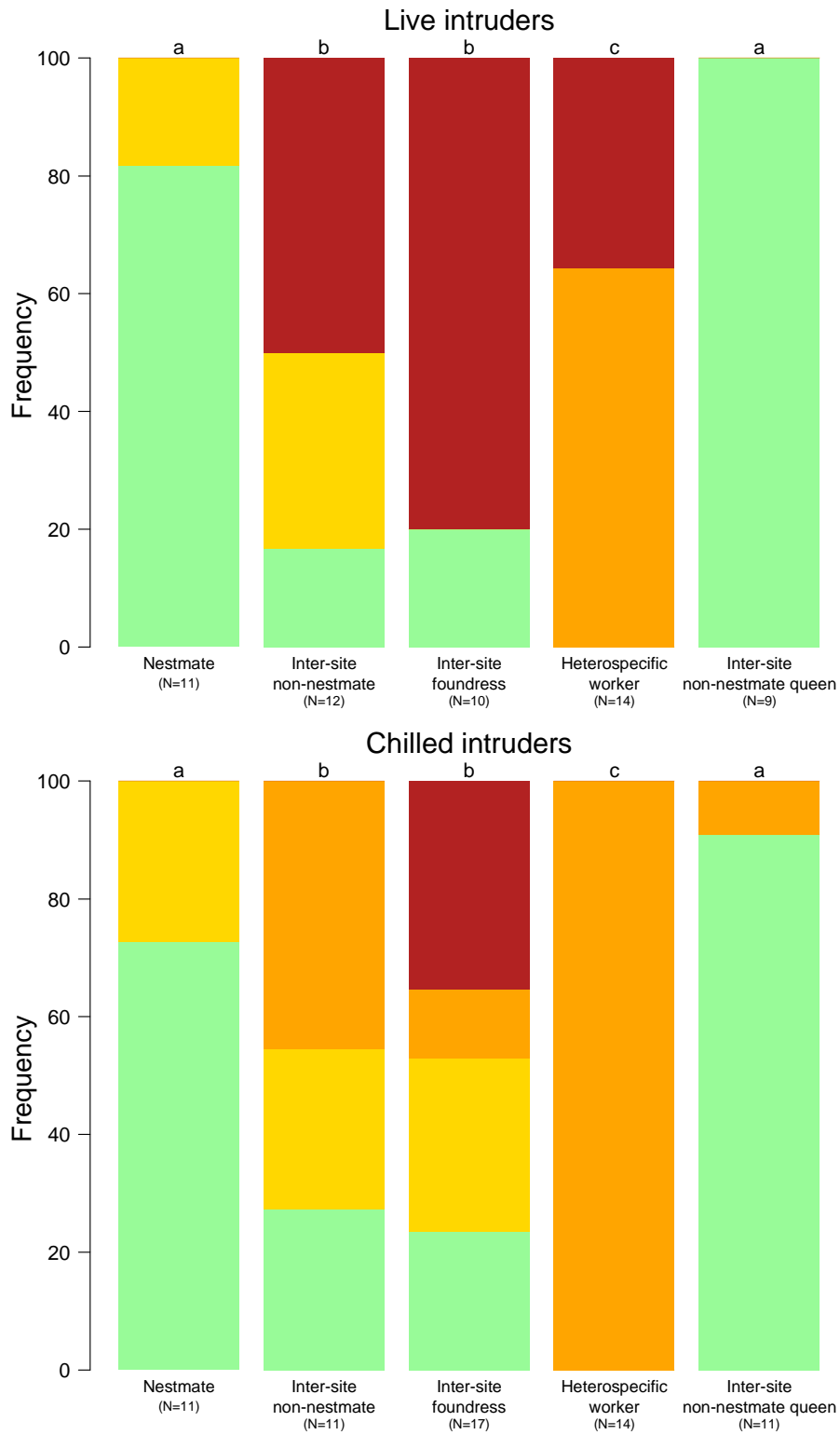
When intruders were deposited on intact nests, the level of aggression differed markedly between the categories of intruders (Fig. 1). Resident workers were not more aggressive toward non-nestmate workers from the same site than toward workers from the other population. Resident workers were more aggressive toward foundresses than toward non-nestmate workers from the same or the other population. The level of aggression was also different between foundresses and heterospecific workers and foundresses were stung more frequently (about 60% vs. 10% of interactions, respectively). Heterospecific workers were mostly recipient of mandibular strikes (Fig.1). In the lab, we found similar patterns of aggression between chilled and live intruders and the scores of aggression also differed between the categories of intruders (Fig. 2) Both live and chilled founding queens were more attacked than heterospecific workers. This strongly contrasted with mature queens than were largely tolerated by resident workers (Fig. 3).



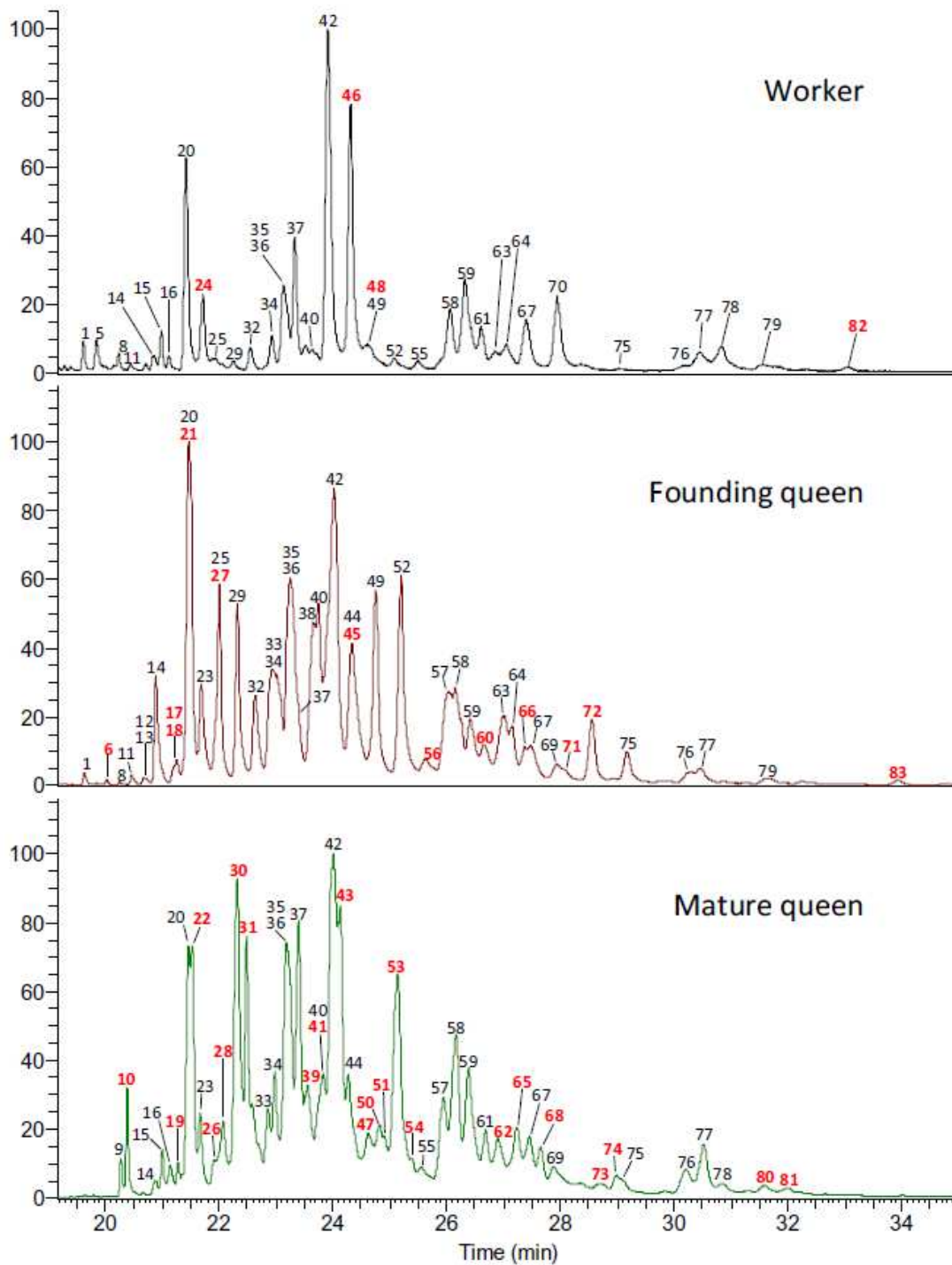
**Figure 1.** Frequencies of each score of aggression toward an introduced ant of different castes on intact nests. Different letters indicate statistical differences (Fisher exact tests followed by Benjamini and Hochberg correction, see appendix).

We detected no difference in aggression scores between chilled and live nestmate workers (Fisher exact test:  $P=1$ ), founding queens (Fisher exact test:  $P=0.09$ ) or mature queens (Fisher exact test:  $P=1$ ) (Fig. 2). In contrast, resident workers were more aggressive toward live inter-site non-nestmates (Fisher exact test:  $P=0.007$ ) and toward live heterospecific workers (Fisher exact test:  $P=0.04$ ) (Fig. 2). In the field and in presence of live intruders in the lab, it is worth noting that holding (score=2) was only observed for homospecific workers or queens but never for foundresses or heterospecific workers and that live or chilled non-nestmate queens were antennated and, at one exception, they were not attacked.





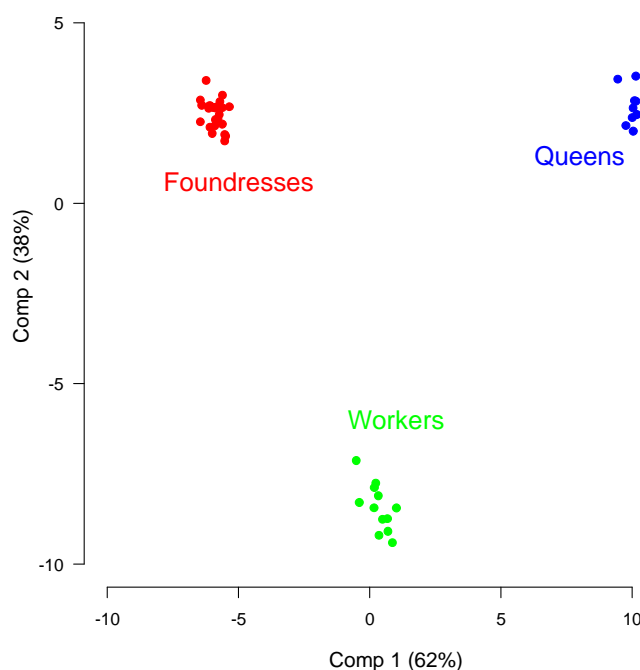
**Figure 2.** Frequencies of each score of aggression toward an introduced live or chilled ant of different castes and fertility status in the laboratory. Different letters indicate statistical differences (Fisher exact tests followed by Benjamini and Hochberg correction, see appendix). Same color legends as in Fig. 1.



**Figure 3.** Representative chromatographs of cuticular profiles of worker, founding queen and mature queen. See Table 1 for identities of the numbered peaks. The compounds specific to each caste are highlighted in red bold.

The cuticular hydrocarbons of *O. hastatus* comprise a mixture of linear and branched (one or two methyl groups) alkanes, alkenes and alkadienes ranging in chain length from 35 to 45

carbons. About 20% (17 out of 83) of compounds were common to all individuals (Figure, 3, Table 1). Twelve hydrocarbons were only found in founding queens and 25 were exclusive to mature queens. The multivariate analysis clearly discriminated the cuticular profiles of workers, foundresses and queens with all samples correctly reassigned in the cross-validation model (error rate=0%;  $P<0.001$ , Fig. 4). This contrasted with the absence of discrimination between the profiles of workers from the two populations (error rate=27%,  $P=0.10$ ).



**Figure 4.** PLS-DA plot of the cuticular profiles of workers, foundresses and queens of *O. hastatus*.

**Table 1.** Mean (minimum, maximum) relative abundance of cuticular compounds for each caste and percentage of each class of hydrocarbons for each caste. Superscript numbers in first column indicate compounds differing in double bond position. ‘x’ indicate uncertain methyl group position. <sup>1-5</sup>: the positions of double bonds in alkenes and alkadienes and their stereochemistry are not known (numbers indicate different compounds). KI: Kovat's indices. Compounds highlighted in bold were found exclusively in foundresses (\*: extrapolated KI using an external standard ranging from n-C<sub>7</sub> to n-C<sub>40</sub>).

Identification	Class	Workers (N=12)	Foundresses (N=25)	Queens (N=14)	KI
1 13- and 11-Methylpentatriacontane	methyl alkane	0.83 (0.16, 4.62)	0.28 (0.03, 1.5)	0.06 (0.01, 0.38)	3523
2 Hexatriacontadiene <sup>1</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.06 (0.01, 0.35)	3529
3 5,x-Dimethylpentatriacontane	dimethyl alkane	0.02 (0, 0.23)	0.02 (0, 0.07)	0 (0, 0)	3544
4 x-Methylpentatriacontane	methyl alkane	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.04 (0.01, 0.11)	3548
5 x-Methylpentatriacontene	methyl alkene	0.27 (0, 0.75)	0.01 (0, 0.08)	0 (0, 0)	3549
<b>6 5-Methylpentatriacontane</b>	<b>methyl alkane</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>0.08 (0.01, 0.25)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>3574</b>

7	x-Methylpentatriacontene	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.03 (0.01, 0.09)	3580
8	Hexatriacontane	n-alkane	0.5 (0, 2.72)	0.08 (0.02, 0.23)	0 (0, 0)	3602
9	Heptatriacontadiene <sup>1</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0.01 (0, 0.03)	1.14 (0.15, 3.24)	3604
10	x-Methylhexatriacontene	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	2.22 (0.87, 5.94)	3615
11	13- and 11- Methylhexatriacontane	dimethyl alkane	0.18 (0.05, 0.48)	0.24 (0.04, 0.8)	0 (0, 0)	3625
12	Heptatriacontadiene <sup>2</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0.09 (0.01, 0.44)	0.05 (0.01, 0.16)	3647
13	Hexatriacontadiene <sup>2</sup>	alkadiene	0.2 (0.03, 0.76)	0.14 (0.01, 0.96)	0 (0, 0)	3653
14	Heptatriacontene <sup>1</sup>	alkene	0.36 (0.04, 1.04)	2.5 (0.39, 5.83)	0.73 (0.15, 2.12)	3669
15	Heptatriacontene <sup>2</sup>	alkene	0.43 (0.07, 1.19)	0.28 (0.01, 1.79)	1.02 (0.09, 2.55)	3682
16	Heptatriacontane	n-alkane	0.22 (0.04, 0.69)	0 (0, 0)	0.46 (0.07, 1.32)	3697
<b>17</b>	<b>x-Methylheptatriacontene<sup>1</sup></b>	<b>methyl alkene</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>0.24 (0.04, 0.83)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>3703</b>
<b>18</b>	<b>x-Methylheptatriacontene<sup>2</sup></b>	<b>methyl alkene</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>0.35 (0.05, 1.24)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>3707</b>
19	x-Methylheptatriacontene <sup>3</sup>	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.57 (0.14, 1.78)	3709
20	13-Methylheptatriacontane	methyl alkane	7.09 (2.84, 13.69)	6.98 (3.29, 11.6)	7.14 (2.2, 15.08)	3725
21	Octatriacontadiene	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	5.47 (3.45, 7.61)	3733
<b>22</b>	<b>x-Methylheptatriacontane</b>	<b>methyl alkane</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>5.23 (2.52, 7.6)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>3734</b>
23	x-Methylheptatriacontene <sup>4</sup>	methyl alkene	0 (0, 0)	2.37 (0.88, 4.11)	1.15 (0.58, 2.32)	3746
24	13,x-Dimethylheptatriacontane	dimethyl alkane	1.44 (0.46, 3.28)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	3752
25	x-Methyloctatriacontene <sup>1</sup>	methyl alkene	0.66 (0.14, 4.41)	0.45 (0, 1)	0 (0, 0)	3769
26	Octatriacontene	alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.59 (0.29, 1.16)	3771
<b>27</b>	<b>5-Methylheptatriacontane</b>	<b>methyl alkane</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>5.64 (2.53, 10.51)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>3774</b>
28	x-Methylheptatriacontene <sup>5</sup>	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	1.14 (0.43, 2.07)	3782
29	Octatriacontane	n-alkane	0.82 (0.04, 5.89)	6.05 (2.58, 8.61)	0 (0, 0)	3804
30	Nonatriacontadiene <sup>1</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	11.27 (6.9, 14.75)	3804
31	x-Methyloctatriacontene <sup>2</sup>	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	3.8 (1.45, 7.63)	3818
32	x,15-Dimethyloctatriacontane	dimethyl alkane	1.23 (0.78, 2.11)	2.5 (1.21, 3.66)	0 (0, 0)	3824
33	Nonatriacontadiene <sup>2</sup>	alkadiene	0.18 (0, 0.4)	4.24 (2.37, 6.71)	0.66 (0.26, 1.58)	3833
34	Nonatriacontadiene <sup>3</sup>	alkadiene	1.91 (0.56, 4.03)	2.81 (1.79, 4.43)	1.42 (0.27, 2.99)	3845
35	Nonatriacontene <sup>1</sup>	alkene	3.47 (2.22, 5.37)	4.87 (1.33, 15.85)	5.24 (3.3, 8.27)	3870
36	x-Methyloctatriacontene <sup>3</sup>	methyl alkene	1.91 (1.11, 3.25)	2.97 (0.79, 9.74)	2.71 (1.31, 4.26)	3874
37	Nonatriacontene <sup>2</sup>	alkene	3.1 (1.01, 5.75)	1.12 (0.36, 1.91)	4.27 (3.15, 5.15)	3886
38	Nonatriacontane	n-alkane	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.9 (0.44, 1.21)	3899
39	x-Methyloctatriacontene <sup>4</sup>	methyl alkene	0.85 (0.22, 1.78)	4.06 (1.72, 5.62)	0 (0, 0)	3901
40	x-Methylnonatriacontene <sup>1</sup>	methyl alkene	0.53 (0, 1.39)	2.28 (1.38, 3.55)	0.76 (0, 1.4)	3911
41	Tetracontadiene <sup>1</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	1.23 (0.47, 2.56)	3918
42	15- and 17- Methylnonatriacontane	methyl alkane	25.27 (20.41, 29.62)	10.35 (6.25, 15.98)	9.67 (6.05, 12.99)	3925
43	Tetracontadiene <sup>2</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	6 (3.64, 9.64)	3938
44	x,12-Dimethylnonatriacontane	dimethyl alkane	10.54 (5.41, 18.44)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	3947
45	x-Methylnonatriacontene <sup>2</sup>	methyl alkene	0 (0, 0)	3.78 (2.34, 6.24)	0.71 (0, 3.25)	3950
<b>46</b>	<b>x-Methylnonatriacontene<sup>3</sup></b>	<b>methyl alkene</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>1.62 (0.82, 2.7)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>3952</b>
47	x-Methylnonatriacontane	methyl alkane	0.51 (0, 0.95)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	3965
48	Tetracontene <sup>1</sup>	alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.75 (0.46, 1.05)	3967
49	5,x-Dimethylnonatriacontane	dimethyl alkane	0.95 (0, 6.36)	6.24 (3.39, 9.54)	0 (0, 0)	3976
50	x-Methylnonatriacontene <sup>4</sup>	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.9 (0.4, 1.65)	3982
51	Tetracontene <sup>2</sup>	alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.54 (0.21, 1.01)	3986
52	x-Methyltetracontene	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	9.51 (5.53, 16.05)	4004*
53	Tetracontane	n-alkane	1.82 (0.26, 6.43)	6.09 (3.57, 11.35)	0 (0, 0)	4006*
54	4-Methyltetracontene	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.13 (0, 0.23)	4020*
55	5,x-Dimethyltetracontane	dimethyl alkane	0.73 (0.51, 0.99)	0 (0, 0)	0.21 (0.12, 0.32)	4033*
<b>56</b>	<b>5-Methyltetracontene</b>	<b>methyl alkene</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>0.37 (0.14, 0.7)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>4039*</b>
57	Hentetracontadiene <sup>1</sup>	alkadiene	0.6 (0, 1.38)	3.68 (1.81, 7.76)	1.57 (0.71, 2.87)	4062*
58	Hentetracontadiene <sup>2</sup>	alkadiene	7.24 (1.89, 12.7)	2.48 (1.59, 4.01)	3.89 (1.65, 6.06)	4079*
59	Hentetracontene	alkene	5.61 (2.38, 9.44)	0.71 (0.26, 1.51)	2.8 (1.24, 4.69)	4095*
<b>60</b>	<b>x-Methylhentetracontane</b>	<b>methyl alkane</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>0.24 (0, 0.8)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>4112*</b>
61	Dotetracontene <sup>1</sup>	alkene	0.94 (0.3, 1.56)	0 (0, 0)	0.75 (0.35, 1.29)	4115*
62	x-Methylhentetracontene <sup>1</sup>	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.76 (0.33, 1.23)	4129*
63	x-Methylhentetracontene <sup>2</sup>	methyl alkene	1.75 (0.59, 3.32)	1.88 (0.86, 2.93)	0 (0, 0)	4134*
64	x-Methylhentetracontene <sup>3</sup>	methyl alkene	1.54 (0.91, 3.52)	0.83 (0.12, 2.09)	0 (0, 0)	4141*
65	Dotetracontadiene <sup>1</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	1.6 (0.89, 2.19)	4150*
<b>66</b>	<b>4-Methylhentetracontene</b>	<b>methyl alkene</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>0.79 (0.1, 2.78)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>4159*</b>
67	13,x-Dimethylhentetracontane	dimethyl alkane	5.13 (2.34, 10.01)	0.79 (0.31, 1.47)	1.01 (0.34, 1.81)	4165*

68	Dotetracontadiene <sup>2</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.69 (0.15, 1.74)	4176*
69	Dotetracontene <sup>2</sup>	alkene	0 (0, 0)	0.45 (0.17, 1.16)	0.27 (0, 1.26)	4192*
70	x,12-Dimethyldotetracontane	dimethyl alkane	5.23 (1.82, 10.01)	0 (0, 0)	0.13 (0, 0.73)	4196*
<b>71</b>	<b>Tritetracontadiene<sup>1</sup></b>	<b>alkadiene</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>0.23 (0, 0.43)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>4204*</b>
<b>72</b>	<b>5,x-Dimethyldotetracontane</b>	<b>dimethyl alkane</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>1.99 (0.56, 4.96)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>4231*</b>
73	Tritetracontene	alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.35 (0.1, 1.07)	4238*
74	Tritetracontadiene <sup>2</sup>	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.83 (0.14, 3.14)	4256*
75	4,x- Dimethyldotetracontane	dimethyl alkane	0.47 (0.09, 1.88)	0.62 (0.18, 1.61)	0.19 (0, 0.81)	4263*
76	Tetratetracontadiene <sup>1</sup>	alkadiene	0.56 (0.23, 1.05)	0.36 (0.09, 0.78)	0.48 (0.13, 1.27)	4327*
77	Tetratetracontadiene <sup>2</sup>	alkadiene	2.31 (0.89, 4.45)	0.28 (0.06, 0.86)	1.34 (0.65, 2.3)	4345*
78	Tetratetracontene	alkene	1.11 (0.25, 2.2)	0.01 (0, 0.11)	0.32 (0.13, 0.78)	4363*
79	Pentatetracontadiene	alkadiene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.24 (0.09, 0.64)	4402*
80	x-Methyltetratetracontene <sup>1</sup>	methyl alkene	0.94 (0.3, 1.79)	0.19 (0.05, 0.41)	0 (0, 0)	4405*
81	x-Methyltetratetracontene <sup>2</sup>	methyl alkene	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.22 (0.06, 0.64)	4423*
82	x-Methyltetratetracontene <sup>3</sup>	methyl alkene	0.56 (0.26, 1.16)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	4480*
<b>83</b>	<b>5,x- Dimethylpentatetracontane</b>	<b>dimethyl alkane</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>0.09 (0.03, 0.3)</b>	<b>0 (0, 0)</b>	<b>4524*</b>

% of each class of hydrocarbons	Workers	Foundresses	Queens
alkane	3.36	12.22	1.36
methyl alkane	33.7	28.8	16.91
dimethyl alkane	25.92	12.49	1.54
alkene	15.02	9.94	17.63
methyl alkene	9.01	22.19	24.61
alkadiene	13	14.32	37.94

## DISCUSSION

In this study, we examined the relative contribution of chemical and behavioral cues on caste discrimination in the ant *O. hastatus*. We showed that resident workers responded differently to the introduction of intruders of different castes and reproductive status. They fiercely attacked foundresses but they were highly tolerant toward non-nestmate mature queens. At the exception of encounters with inter-site non-nestmates, we provided evidence that chilled intruders tended to experience similar levels of aggression than live individuals, which suggests that the decision of resident workers to behave aggressively probably relies on the perception of the chemical signatures of intruders.

We found that *O. hastatus* possesses relatively uncommon cuticular compounds with very long chained hydrocarbons in comparison to the typical compounds reported in many ant species (Martin and Drijfhout 2009, but see Menzel et al. 2008). In particular, queens of *O. hastatus* were characterized by high amounts of specific n-alkadiene (about 38% of cuticular profiles) and both founding and mature queens showed a high proportion of methylalkenes (about 20%), which are relatively rare in ants (Martin and Drijfhout 2009). In the field, workers displayed no difference in aggressiveness in presence of conspecific non-nestmate workers from either population, which is consistent with the lack of discrimination in the cuticular profiles between individuals from each site. Importantly, our analysis revealed both

quantitative and qualitative differences in cuticular signatures between workers, founding and mature queens. Several compounds were only found either in founding or mature queens and represent candidate molecules that could specifically advertise caste and fertility status (Table 1). Future experiments should deploy bioassays to first confirm that hydrocarbons are actually used by ants to discriminate castes and then to attempt identifying what cuticular compounds advertise the fertility status of founding and mature queens (Smith et al. 2012).

The modulation of the behavioral response of resident workers toward intruders of different categories provides indirect support to the hypothesis that individuals respond to specific compounds bear by intruders, and not simply to the perception of unfamiliar profiles. First, workers did not simply react to the chemical distance to intruders to reach their decision to attack. Indeed, the chemical distance from workers to mature queens considering all cuticular hydrocarbons was greater than to foundresses but the former were never attacked. This might suggest that a set of compounds, specific to each caste, is involved in the highest aggression toward founding queens and the highest tolerance toward mature queens. We also found that the frequency of mandibular strikes was almost 6 times more important for heterospecific workers than for founding queens (all data pooled: 85% vs. 15 %, respectively). Conversely, founding queens were almost four times more likely to be stung than heterospecific workers (55% vs. 15%, respectively). Resident workers thus attempted to kill foundresses while they mostly tended to expel, more or less aggressively, heterospecific workers. In addition, it is worth noting that mandibular strikes are generally used to bounce intruders away from nests (Carlin and Gladstein 1989) and expose workers at less risk than sting attempts where individuals are also vulnerable to reciprocal sting, notably from foundresses. Resident workers may thus modulate their aggressive display depending on the fitness consequences of accepting intruders. The cost of accepting founding queens, because of their reproductive potential, is magnified in comparison to non-nestmate conspecific or heterospecific workers. Our results thus matched the prediction that resident workers would display highly aggressive responses to prevent the intrusion of these prospective queens, which could jeopardize the genetic integrity of colonies (Reeve 1989). In French Guiana, the density of *O. hastatus* colonies approximates 25 nests per hectare and about half nests contained gynes (mean=14 gynes, range: 1 - 80). It thus does not seem unlikely that resident workers of established colonies regularly encounter foundresses seeking a site to establish their colonies and that they developed strategies to eliminate supernumerary reproductives. The response of resident workers toward live intruders tended to be more intense in the lab than in the field. One likely

hypothesis is that testing ants in arenas prevented them to escape and this can potentially result in an escalation of aggressive behaviors. Although no major influence of chilling on the patterns of aggression between intruders was detected, we noticed that anesthesia tended to reduce the intensity of agonistic interactions and that resident workers displayed more variable response to chilled than to live foundresses. In a comparative methodological study on aggression bioassays in ants, Roulston et al. (2003) already documented that pairing one live and one dead individual yield inconsistent results. This does not necessarily imply that individuals failed to discriminate conspecifics or castes but rather that workers could display variable aggressive response threshold to inanimate intruders, as immobile aliens do not represent an immediate threat.

When resident workers were faced to non-nestmate mature queens, we observed the highest degree of tolerance and the lowest level of variation in acceptance rate. In other species, foreign mature queens are aggressed (*Pachycondyla luteipes*: Kikuchi et al. 2007; *Tapinoma erraticum* and *Linepithema humile*: Cournault and de Biseau 2009). The existence of such contrasting patterns raises the question of determining under what circumstances should workers discriminate nestmate from non-nestmate queens. It should first be mentioned that these studies were conducted on species differing in their social structures. The life-history traits accompanying polygyny could influence the balance between the costs and benefits associated to the acceptance of additional reproductives and could impose constraints on recognition systems that are absent in monogynous species (Bourke and Franks 1995). Nevertheless, nesting strategy might constitute a potential factor explaining the different responses to queens across species. Both *L. humile* and *T. erraticum* attack alien queens and, among common features, both species occupy instable nests and frequently emigrate (Meudec 1978, Heller and Gordon 2006). Frequent nest-moving likely increases the opportunities of encountering alien colonies. This could explain the need for workers to discriminate between nestmate and non-nestmate queens and thus the existence of aggression directed toward mature reproductives in these species. Although relocation in response to nest degradation can occur in *O. hastatus* (pers. obs.), interactions between workers and unrelated mature queens are probably an exceptional event in the field. Therefore, workers are not predicted to have evolved abilities to discriminate between related and unrelated mature queens as the potential costs associated to recognition failure can have fatal consequences for their colonies (Reeve 1989). A similar reasoning also likely explains the

tolerance expressed by resident workers toward highly fertile queens in *C. floridanus* (Moore and Liebig 2010).

Aggression toward individuals with a reproductive potential is also involved in worker policing, where individuals attempting to lay eggs are aggressed or killed by nestmate workers (Iwanishi et al. 2003, Kawabata et al. 2005). Several studies have demonstrated the existence of qualitative and/or quantitative differences in the chemical signatures between queens and reproductive workers (Dietmann et al. 2005; Smith et al. 2008, 2012). Across species, it thus appears that the cuticular profiles of founding queens or reproductive workers are distinct from those of queens. However, it is not known whether reproductive workers in queenless colonies and foundresses from the same species advertise similarly their fertility status and are recipient of comparable level of aggression. This would be worth investigating to determine whether workers use the same information and obey similar rules across contexts to control reproduction and maintain genetic structure within colonies.

In 2010, Moore and Liebig advanced three hypotheses to explain the tolerance of non-nestmate high fertility queen but the rejection of low fertility queens in monogynous colonies of *C. floridanus*. They proposed that such pattern could result either from the lack of colonial cues involved in nestmate recognition in highly fertile queens, from the fact that a strong fertility signal masks colony-membership cues or that workers prioritize fertility signal over colonial cues in their decision to accept or reject an intruder. In their study, the cuticular profiles of lowly fertile queens and workers showed no difference and the authors privileged the hypothesis that fertility signaling interferes with the perception of colonial cues. In contrast, the cuticular profiles of workers, founding and mature queens are clearly distinguishable in *O. hastatus* and workers adopt a different response to each caste. In addition, and more generally, the maintenance of monogyny implies that workers reject any non-nestmate prospective reproductives but also that they oppose the adoption of foundresses originating from their own colonies. Because workers from monogynous colonies should show no kin discrimination to decide or not to evict any additional reproductive, they are expected to respond aggressively to the typical blend of cuticular compounds bear by founding queens, irrespective of their colonial cues. We thus propose that resident workers should prioritize cues advertising fertility status over colonial cues to allow colonies to preserve genetic structure while minimizing errors in recognition and its associated fitness costs.



In conclusion, our study provided evidence that resident workers of colonies display a gradual response to intruders differing in their fertility status and it also suggested that cuticular profiles are likely involved in caste discrimination. In ants, it is admitted that monogyny is the ancestral social structure and that polygyny via the re-adoption of founding queens by established nests evolved several times (Hughes et al. 2008, Boomsma et al. 2014). Under a proximal perspective, the acceptance of supernumerary females implies a shift in the production of cuticular chemicals by reproductives and/or in the processing of olfactory cues by resident workers in response to environmental constraints. The development of comparative approaches in socially polymorphic species where monogynous and polygynous social forms co-exist in the same population should prove fruitful to provide insights into the necessary changes in recognition systems that drive the transition from single queen to multi-queens colonies (Trible and Ross 2016).

### **Acknowledgments**

KB was supported by a PhD grant from the French Ministry of Higher Education and Research. We thank the Laboratoire Environnement de Petit Saut in French Guiana for furnishing logistical assistance and Abel Bernadou for his insightful comments on a previous version of the manuscript. We are also grateful to two anonymous reviewers for their insightful comments.

## REFERENCES

- Barker M, Rayens W (2003) Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics* 17, 166-173
- Bernadou A, Heinze J (2013) Mating-associated changes in the behaviour of *Leptothorax gredleri* ant queens. *Ethology* 119: 634-643
- Bernadou A, Ruther J, Heinze J (2015) Avoid mistakes when choosing a new home: Nest choice and adoption of *Leptothorax* ant queens. *J Ins Physiol* 79: 88-95
- Bhatkar A, Whitcomb WH (1970) Artificial diet for rearing various species of ants. *Fla Entomol* 53: 229-232
- Blomquist GJ, Bagnères AG (2010) *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Boomsma JJ, Huszár DB, Pedersen JS (2014) The evolution of multiqueen breeding in eusocial lineages with permanent physically differentiated castes. *Anim Behav* 92: 241-252
- Bourke AFG, Franks NR (1995) *Social Evolution in Ants*. Monographs in Behavior and Ecology. Princeton University Press, Princeton
- Carlin NF, Gladstein DS (1989) The "bouncer" defense of *Odontomachus ruginodis* and other Odontomachinae ants (Hymenoptera: Formicidae) *Psyche* 96:1-19
- Camargo RX, Oliveira PSO (2012) Natural history of the Neotropical arboreal ant, *Odontomachus hastatus*: Nest sites, foraging schedule, and diet. *J Ins Science* 12: 48
- Chernenko A, Helanterä H, Sundström L (2012) Colony kin structure and queen recruitment in the ant *Formica fusca* (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* 16: 93-100
- Cournault L, de Biseau J-C (2009) Hierarchical perception of fertility signals and nestmate recognition cues in two dolichoderine ants. *Behav Ecol Sociobiol* 63: 1635-1641
- Devigne C, de Biseau J-C (2012) The differential response of workers and queens of the ant *Lasius niger* to an environment marked by workers: Ants dislike the unknown. *Behav Proc* 91: 275-281
- Dietemann V, Liebig J, Hölldobler B, Peeters C (2005) Changes in the cuticular hydrocarbons of incipient reproductives correlate with triggering of worker policing in the bulldog ant *Myrmecia gulosa*. *Behav Ecol Sociobiol* 58: 486-496
- Evans JD (1996) Queen longevity, queen adoption, and posthumous indirect fitness in the facultatively polygynous ant *Myrmica tahoensis*. *Behav Ecol Sociobiol* 39: 275-284

- Fortelius W, Rosengren R, Cherix D, Chautems D (1993) Queen recruitment in a highly polygynous supercolony of *Formica lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). *Oikos* 67: 193-200
- Heinze J, Keller L (2000) Alternative reproductive strategies: a queen perspective in ants. *Trends Ecol Evol* 15: 508-512
- Heller NE, Gordon DM (2006) Seasonal spatial dynamics and causes of nest movement in colonies of the invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). *Ecol Entomol* 31: 499-510
- Hervé M (2014) RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions. URL: <http://cran.r-project.org/package=RVAideMemoire>.
- Holzer B, Meunier J, Keller L, Chapuisat M (2008) Stay or drift? Queen acceptance in the ant *Formica paralugubris* *Insect Soc* 55: 392-396
- Hughes WOH, Oldroyd BP, Beekman M, Ratnieks FLW (2008) Ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. *Science* 320: 1213-1216
- Iwanishi S, Hasegawa E, Ohkawara K (2003) Worker oviposition and policing behaviour in the myrmicine ant *Aphaenogaster smythiesi japonica* Forel. *Anim Behav* 66: 513-519
- Kawabata S, Tsuji K (2005) The policing behavior ‘immobilization’ towards ovary-developed workers in the ant, *Diacamma* sp. from Japan. *Insec Soc* 52: 89-95
- Kikuchi T, Tsuji K, Ohnishi H, Le Breton J (2007) Caste-biased acceptance of non-nestmates in a polygynous ponerine ant. *Anim Behav* 73: 559-565
- Liebig J (2010) Hydrocarbon profiles indicate fertility and dominance status in ant, bee, and wasp colonies. In: Blomquist GJ, Bagnères AG (eds) *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, MA, pp 254-281
- Lone SR, Chakravarthi A, Sharma VK (2012) Sex and age related changes in the locomotor activity and phototactic behaviors of two closely related species of *Camponotus* ants *J Insect Physiol* 58:75-82
- Martin S, Drijfhout F (2009) A review of ant cuticular hydrocarbons. *J Chem Ecol* 35: 1151-1161
- Menzel F, Blüthgen N, Schmitt T (2008) Tropical parabiotic ants: highly unusual cuticular substances and low interspecific discrimination. *Front Zool* 5: 1
- Meudec M (1978) Response to and transport of brood by workers of *Tapinoma erraticum* (Formicidae; Dolichoderinae) during nest disturbance. *Behav Proc* 3: 199-209

- Meunier J, Reber A, Chapuisat M (2011) Queen acceptance in a socially polymorphic ant. *Anim Behav* 81: 163-168
- Monnin T (2006) Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann Zool Fenn* 43: 515-530
- Moore D, Liebig J (2010) Mixed messages: fertility signaling interferes with nestmate recognition in the monogynous ant *Camponotus floridanus*. *Behav Ecol Sociobiol* 64: 1011-1018
- Oliveira PS, Camargo RX, Fourcassié V (2011) Nesting patterns, ecological correlates of polygyny and social organization in the neotropical arboreal ant *Odontomachus hastatus* (Formicidae, Ponerinae). *Insect Soc* 58: 207-217
- R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reeve HK (1989) The Evolution of conspecific acceptance thresholds. *Am Nat* 133: 407-435
- Roulston TH, Buczkowski G, Silverman J (2003) Nestmate discrimination in ants: effect of bioassay on aggressive behavior. *Insect Soc* 50:151-159
- Smith AA, Millar J, Hanks L, Suarez A (2012) Experimental evidence that workers recognize reproductives through cuticular hydrocarbons in the ant *Odontomachus brunneus*. *Behav Ecol Sociobiol* 66: 1267-1276
- Smith AA, Hölldobler B, Liebig J (2008) Hydrocarbon signals explain the pattern of worker and egg policing in the ant *Aphaenogaster cockerelli*. *J Chem Ecol* 34: 1275-1282
- Smith AA, Millar JG, Suarez AV (2016) Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* trap-jaw ants. *J Exp Biol* 219: 419-430
- Souza DJ, Della Lucia TMC, Lima ER (2005) Queen adoption in colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera: Formicidae). *Behav Proc* 70:62-68
- Stuart RJ, Gresham-Bissett L, Alloway TM (1993) Queen adoption in the polygynous and polydomous ant, *Leptothorax curvispinosus*. *Behav Ecol* 4: 276-281
- Sturgis SJ, Gordon DM (2012) Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): a review. *Myrmecol News* 16: 101-110
- Sundström L (1997) Queen acceptance and nestmate recognition in monogyne and polygyne colonies of the ant *Formica truncorum*. *Anim Behav* 53: 499-510
- Tribble W, Ross KG (2016) Chemical communication of queen supergene status in an ant. *J Evol Biol* 29: 502-513

- Vander Meer RK, Porter SD (2001) Fate of newly mated queens introduced into monogyne and polygyne *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) colonies. *Ann Entomol Soc Am* 94: 289-297
- van Zweden JS, d'Ettorre P (2010). Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. In: Blomquist GJ, Bagnères AG (eds) *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, MA, pp 222-243
- Zinck L, Denis D, Hora RR, Alaux C, Lenoir A, Hefetz A, Jaisson P (2009) Behavioral and chemical correlates of long-term queen adoption in the facultative polygynous ant *Ectatomma tuberculatum*. *J Insect Behav* 22: 362-374

**Appendix:** Results of Fisher exact tests to compare the frequencies of the scores of aggression between treatments. *P*: non-adjusted *P*-values; *Pa*: adjusted *P*-values after Benjamini and Hochberg correction.

A) Interactions of intact nests (Figure 1)

	Nestmate worker	Intra site non-nestmate worker	Inter site non-nestmate worker	Intra site foundresses
Intra site non-nestmate worker	<i>P</i> =0.14 <i>Pa</i> =0.15			
Inter site non-nestmate worker	<i>P</i> =0.06 <i>Pa</i> =0.07	<i>P</i> =0.71 <i>Pa</i> =0.71		
Intra site foundress	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> =0.006 <i>Pa</i> =0.009	
Heterospecific worker	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001

B) Dyadic interactions with live intruders (Figure 2)

	Nestmate worker	Inter site non-nestmate worker	Inter site foundress	Heterospecific worker
Inter site non-nestmate worker	<i>P</i> =0.002 <i>Pa</i> =0.003			
Inter site foundress	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> =0.21 <i>Pa</i> =0.23		
Heterospecific worker	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> =0.001 <i>Pa</i> =0.002	
Inter site non-nestmate queen	<i>P</i> =0.48 <i>Pa</i> =0.48	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> =0.001	<i>P</i> <0.001 <i>Pa</i> <0.001

C) Dyadic interactions with chilled intruders (Figure 2)

	Nestmate worker	Inter site non-nestmate worker	Inter site foundress	Heterospecific worker
Inter site non-nestmate worker	<i>P</i> =0.037 <i>Pa</i> =0.046			

Inter site foundress	$P=0.025$ $Pa=0.037$	$P=0.08$ $Pa=0.09$		
Heterospecific worker	$P<0.001$ $Pa<0.001$	$P=0.003$ $Pa=0.005$	$P<0.001$ $Pa=0.001$	
Inter site non-nestmate queen	$P=0.21$ $Pa=0.21$	$P=0.01$ $Pa=0.019$	$P=0.002$ $Pa=0.005$	$P<0.001$ $Pa<0.001$

### Electronic Supplementary Materials

**Movie 1:** Movie of the introduction of a non-nestmate intra-site worker (marked with a white dot on the head) on a monogynous colony (duration: 75 sec).

**Movie 2:** Movie of the introduction of a founding queen (marked with a white dot on the head) on a monogynous colony (duration: 19 sec).





# CHAPITRE 4

## RÉSUMÉ

Chez les fourmis, la perception par les ouvrières des indices ou signaux émis par les reines induisent des réactions comportementales (soumission, comportement de soin) et/ou physiologiques (restriction de la reproduction) spécifiques qui contribuent à la division du travail reproductif au sein des colonies. Cependant, la nature des composés perçus par les reines et régulant les interactions sociales au sein de la caste reproductrice a été relativement peu étudiée. Les reines fondatrices constituent un modèle pertinent pour aborder cette problématique. En effet, chez de nombreuses espèces les reines récemment fécondées peuvent s'associer et coopérer pour fonder une nouvelle colonie (pléomérose). Au début de la fondation, les reines interagissent paisiblement mais elles peuvent initier ultérieurement des relations agonistiques conduisant à la survie d'une unique reine.

Ce chapitre est consacré à l'étude des interactions entre reines fondatrices chez la fourmi *Lasius niger*. Nous avons confronté des reines de statuts de fertilité équivalents ou différents. En utilisant l'agressivité comme réponse, Nous avons testé l'influence de l'état physiologique, reflété par les hydrocarbures cuticulaires, des réserves lipidiques et de la taille des individus sur la nature des interactions sociales. Les résultats indiquent que l'agressivité des reines dépend de leur propre état physiologique et de l'état physiologique des reines rivales. Notre étude suggère en outre que l'estimation de la fertilité des individus pourrait reposer sur la perception des hydrocarbures cuticulaires.

## **Onset of fights and mutual assessment in ant founding queens**

Kévin BERTHELOT<sup>1</sup>, Felipe RAMON PORTUGAL<sup>2</sup> and Raphaël JEANSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse; CNRS, UPS, France

<sup>2</sup>ENFA - Evolution et Diversité Biologique, Université de Toulouse; CNRS, UPS, France

## ABSTRACT

In animals, the progress and outcomes of contests can be influenced by an individual's own condition, its opponent's condition or a combination of both. The use of chemical information to assess the quality of rivals has been underestimated despite its central role in the regulation of social interactions in many taxa. Here, we studied pairwise contests between founding queens of the ant *Lasius niger* to investigate whether the decision to engage in agonistic interactions relies on self or mutual assessment. Queens modulated their aggressive behaviours depending both on their own status and their opponent's status. We showed no influence of lipid stores or size on the onset of fights. However, differences in cuticular chemical signatures linked to fertility status accurately predicted the probability of behaving aggressively in pairs. Our study thus suggests that ant queens could rely on mutual assessment via chemical cues to make informed decisions about fight initiation.

**Keywords:** aggression, contests, cuticular hydrocarbons, fertility cues

## INTRODUCTION

Animal contests occur when individuals attempt to monopolise a resource such as a mate, prey or shelter. To limit costly fights, individuals can estimate their own condition (self assessment) or compare their condition relatively to their rivals' one (mutual assessment) based on a variety of traits including body size, weaponry, metabolic rate or energetic stores (Arnott and Elwood, 2009; Hardy and Briffa, 2013). Research on arthropod contests largely focused on visual, auditory and/or vibratory cues, to the detriment of understanding the role of chemical cues despite their importance in the regulation of interactions (Hardy and Briffa, 2013). Though some studies examined how chemicals released during fight impact the progress and outcomes of contests (Goubault et al., 2006), the constitutive expression of chemical cues and their putative role in the decision to engage in aggressive interactions still remains an open question.

Social insects are relevant models to address this issue since their behaviours heavily rely on chemical communication, which conveys a diversity of information (Blomquist and Bagnères, 2010). Many studies highlighted that breeders advertise their status of fertility with cuticular hydrocarbons and that these compounds are involved in the regulation of reproductive division of labor within colonies (Monnin, 2006; Liebig, 2010). Colony foundation represents a critical stage where conflicts are intense among females aiming at monopolising reproduction. Competition leading to queen selection can notably arise in species reproducing by colony fission and in associations of founding queens (Cronin and Monnin, 2009). In several ant species, young mated queens can either found their colony alone or cooperatively with other queens (pleometrosis) (Bernasconi and Strassmann, 1999). Upon the emergence of the first workers, queens in most pleometrotic associations engage in fatal fights and all but one queen perish. In *Lasius niger*, aggression between reproductives is believed to be decisive for determining which queen survives and the involvement of workers in fights may only have a marginal influence on the outcome of queen selection (Sommer and Hölldobler, 1995; Aron et al., 2009). Across species, earlier work showed that several factors including queens' initial mass, weight loss during foundation, body size, productivity and proximity to the brood influence survival (Aron et al. 2009; Balas and Adams, 1996; Bernasconi and Keller, 1996, 1998; Sommer and Hölldobler, 1995). If these studies provided insights into the mechanisms driving the loss of cooperation in pleometrotic associations, they did not inform on the behavioural rules and information used by queens to start fighting.

The benefit of cooperative foundation lies mostly in the production of a larger worker force that allows incipient colonies to be more efficient at brood raiding and better resist attacks (Bernasconi and Strassmann, 1999). In pleometrotic associations, highly fertile queens are predicted to attack lowly fertile queens as they represent potential competitors that do not pay the costs of cooperation and increase their chances of winning fights by retaining their resources.

Here, we paired founding queens of *L. niger* differing in fertility to investigate which factors best predicted the onset of aggressive interactions. We asked whether the decision to behave aggressively relies on energetic stores, on an assessment of morphological traits and chemical signatures of participants, or on a combination of these factors.

## **MATERIALS & METHODS**

Queens were collected after nuptial flight on July 2015 at two locations separated by 40 km (43°17'N, 1°13'E and 43°33'N, 1°28'E, Haute-Garonne, France) and were housed individually in glass tubes. We aimed at obtaining queens differing in their fertility status by exposing them at two temperatures: half of the queens were placed into a climate dark room (25°C) (highly fertile queens, N=80) and the other half were maintained in a cooled incubator at 5°C to delay ovarian activation (lowly fertile queens, N=80). No queens laid eggs during their stay at 5°C.

After 30 days, lowly fertile queens were removed from the incubator and placed into a dark room at 25°C for 72 hours. Upon their removal from incubator, lowly fertile queens laid eggs. Forty-eight hours before starting experiments, the number of eggs produced over 24 h was counted in a random subset of 25 lowly and 25 highly fertile queens. We also counted the total number of brood items (eggs, larvae and cocoons) produced by each queen. We compared the number of brood items using *t*-tests on square-root transformed data.

Behavioural trials consisted in dyadic encounters between a dead (hereafter, stimulus) and a living queen (hereafter, focal) that were conducted during daytime under red light in a half-circular arena (height: 0.5 cm, diameter: 3 cm). Confronting a live to a dead queen is the only way to evaluate a queen's decision to attack without the confounding effect of her rival fighting. Half of the queens in each treatment were haphazardly selected and killed by freezing. A maximal delay of 30 minutes was permitted between queen's sacrifice and her introduction in the arena. The assignment of queens between treatments (low or high fertility, focal or stimulus queens) was balanced between populations and each pair comprised queens

from each population. The focal queen was introduced first into the arena and after 5 min of acclimation the stimulus queen was gently added. All queens were tested once. Arenas were video-recorded with a camera (Sony® Handycam HDR-XR350). All video-recordings were analysed blindly to treatment. We recorded the behaviour of the focal queen for 5 minutes after the first contact with the stimulus queen. A binary score of aggression was used with 0=no aggressive interactions and 1=presence of aggressive interactions (biting and gaster flexion). Aggression between treatments was compared with a  $\chi^2$ -test followed by a multiple comparison test (Zar, 1999).

We then assessed body size by measuring head width (minimum width across the eyes) to the nearest  $10^{-3}$ mm using a stereomicroscope Nikon SMZ1000 at a magnification of 40X. We assessed energetic stores by measuring internal lipids in thorax and abdomen using chloroform baths (difference between dry weight before and after chloroform baths gives the amount of lipids, Bazazi et al., 2016). Lipid stores and head size were compared using a two-way ANOVA on square root transformed data.

Testing our hypotheses required to characterise the chemical signature of each queen. Ant bodies were individually soaked in 0.5 ml of pentane (Merck®, Darmstadt, Germany) for 10 minutes (Blomquist, 2010). GC-MS analysis was performed on a mass spectrometer ISQ™QD Single Quadrupole GC-MS System (Thermo Fisher Scientific), fitted with a capillary column (Restek RTX-5MS 30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m film thickness, 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane) and a splitless injector (280°C). Oven temperature was maintained at 70°C after sample injection (2  $\mu$ l), then programmed at 20°C/min to 180°C, then 5°C/min to 320°C and held for 5 min. Peak areas were calculated by manual integration using Xcalibur 2.2 SP1 48 software. A total of 42 hydrocarbons, identified by mass spectra and retention indices, were used in the analysis (Table S1, Fig. S1). For each individual, we calculated the relative abundance of each compound by dividing the area of each peak by total area of all peaks. Ten pairs for which the analysis of the cuticular hydrocarbons of one queen failed were discarded. Peak areas were log normalized after adding a constant value of 0.001 (Aitchison, 1986). We ran a first discriminant analysis (PLSDA) (Hervé, 2014) to identify which cuticular compounds contributed most towards partitioning lowly and highly fertile queens. Queen's fertility signature was obtained by selecting compounds with VIP (Variable Important in Projection) scores above 1 (i.e. compounds highly influential in discrimination) to run an additional PLSDA. For each queen, we calculated the Cartesian distance between her coordinates on the PLSDA and the coordinates of the centroid for all highly fertile queens

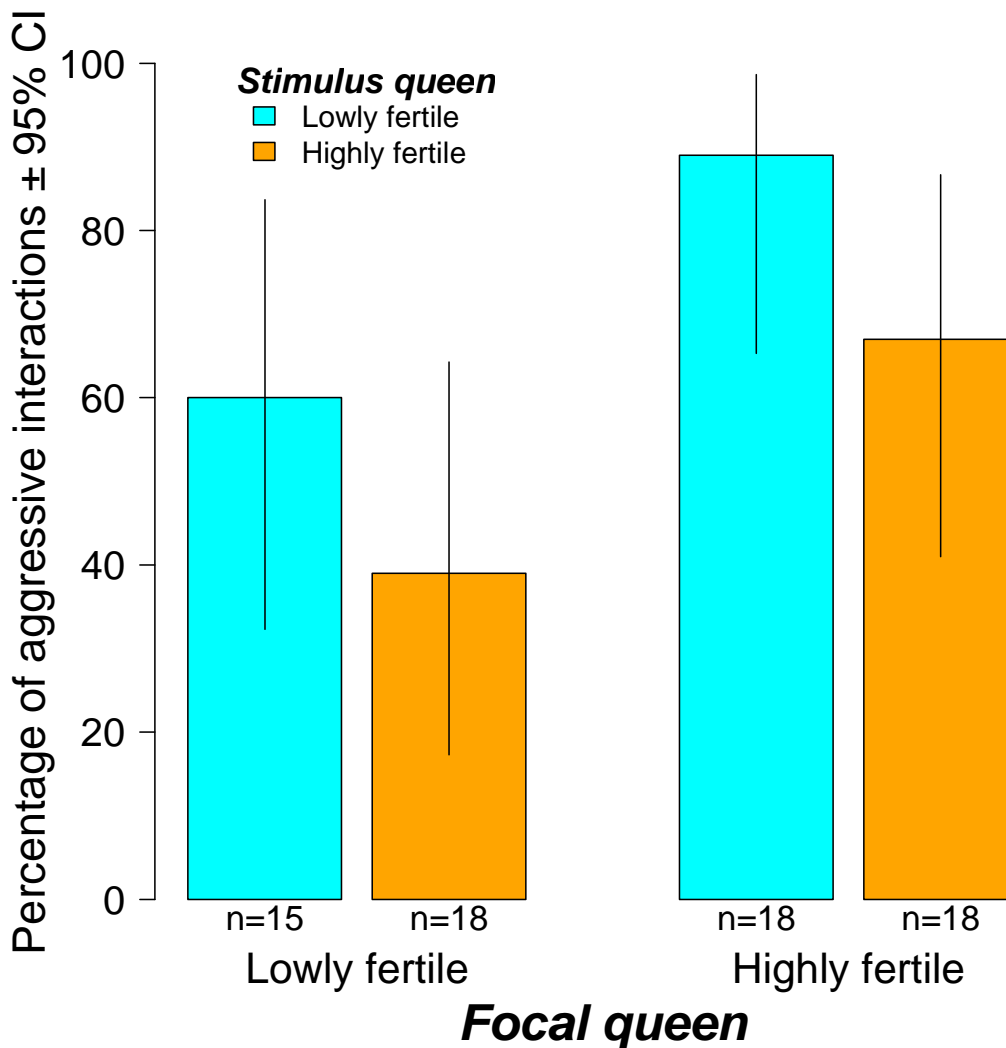
(Fig. S2). A large distance reveals an important difference between the chemical profile of a queen and the typical signature associated with high fertility. We next conducted a binary logistic regression to predict aggression patterns. Predictors were head size, lipid stores (normalised by head size), the distance of each queen to the typical high fertility signature and the relevant interactions. The response variable was presence or absence of aggression. We next ran an additional logistic regression using only significant predictors to calculate odds-ratio.

We performed an additional experiment to determine the influence of cold treatment by comparing lowly fertile queens that experienced or not cold exposure. We collected queens after nuptial flights on June 2016 at the same locations than queens collected in 2015. Upon collection, queens were placed individually in glass tubes for 72 hours in the climate room (25°C). We counted egg production over 24 hours prior experiment and we tested 21 pairs of these lowly fertile queens that did not experience cold exposure to assess aggression. The cuticular profiles of a random subset of 12 queens from each population were analysed. All analyses were performed with R 3.2.1 (R Development Core Team, 2015). Results are reported as mean  $\pm$  SD.

## RESULTS & DISCUSSION

We verified that queens assigned to lowly and highly fertility treatments differed in fertility. Over 24 hours, lowly fertile queens laid fewer eggs than highly fertile queens (lowly fertile queens:  $4.2 \pm 2.7$ ,  $N=25$ , highly fertile queens:  $12.9 \pm 8.8$ ,  $N=25$ ;  $t$ -test:  $t_{48}=4.75$ ,  $P<0.001$ ). In total, lowly fertile queens produced less brood items ( $8.5 \pm 4.8$ ,  $N=66$ ) than highly fertile queens ( $76.6 \pm 18.3$ ,  $N=72$ ) ( $t$ -test:  $t_{136}=33.33$ ,  $P<0.001$ ). We next determined whether aggression varied between treatments. In our study, queens started to lay eggs alone before being paired. This absence of early social experience contrasts with natural conditions where queens associate immediately after mating and we can speculate that this explains the high level of aggression. Nevertheless, we found that queens modulated their aggressive behaviours depending on both their own status and their rival's status ( $\chi^2=9.89$ ,  $df=3$ ,  $P=0.019$ ) with highly fertile queens being twice more aggressive toward lowly fertile stimulus queens than lowly fertile queens toward highly fertile stimulus queens (multiple comparison test:  $q=4.80$ ,  $k=4$ ,  $P<0.01$ ) (Fig. 1). Lipid stores differed between lowly ( $7.13 \pm 1.25$  mg,  $N=66$ ) and highly ( $2.67 \pm 0.82$  mg,  $N=72$ ) fertile queens ( $F_{1,134}=602.62$ ,  $P<0.001$ ) but not between focal ( $4.73 \pm 2.39$  mg,  $N=69$ ) and stimulus ( $4.87 \pm 2.56$  mg,  $N=69$ ) queens ( $F_{1,134}=0.30$ ,

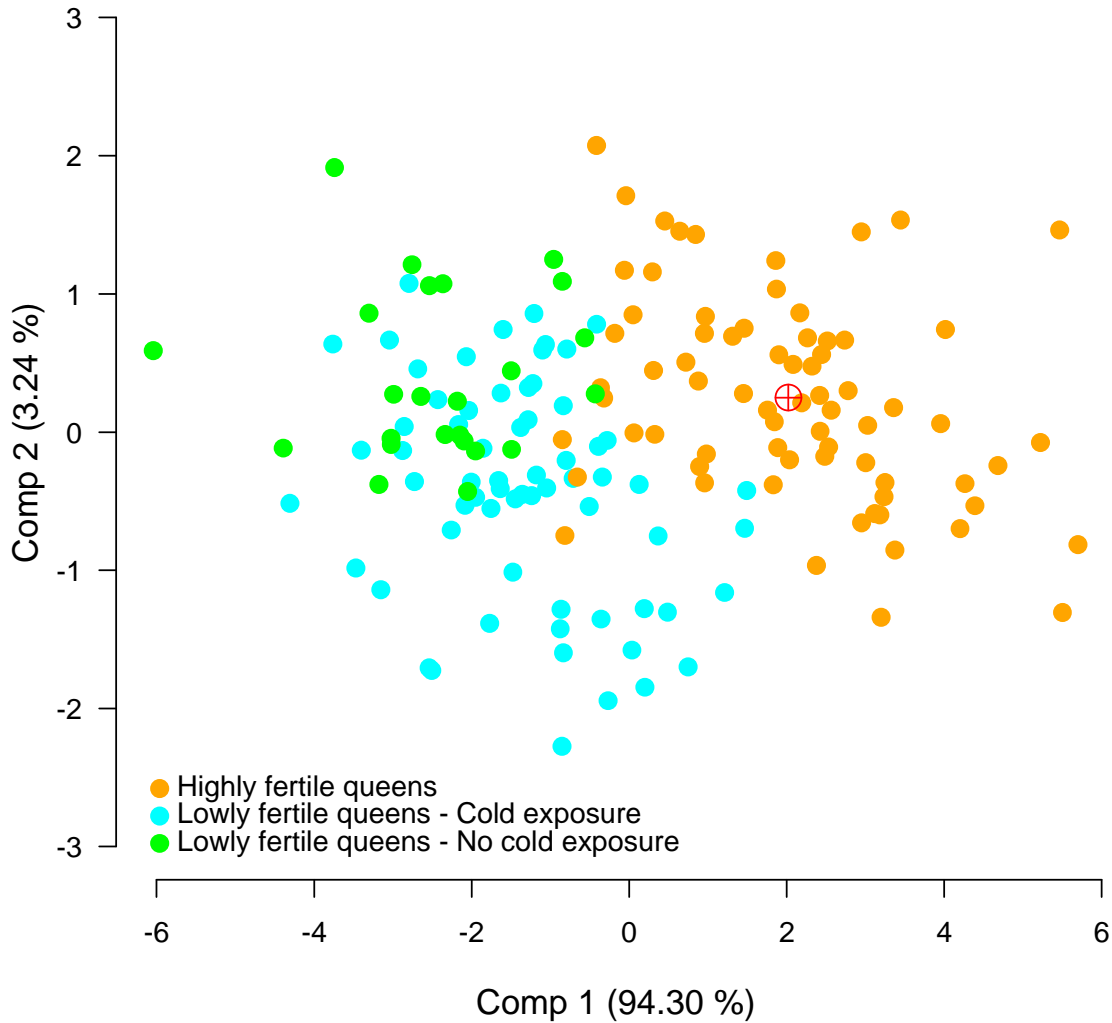




**Figure 1.** Proportion of aggressive contests between focal and stimulus queens as function of their fertility.

$P=0.58$ ). Head size did not vary with fertility status ( $F_{1,134}=0.39$ ,  $P=0.53$ ) or between focal and stimulus queens ( $F_{1,134}=0.51$ ,  $P=0.47$ ).

Because differences between lowly and highly fertile queens could result from cold exposure and not from difference in fertility, we performed an additional experiment. We found no difference in egg number produced by lowly fertile queens that experienced cold ( $8.5 \pm 4.8$ ,  $N=66$ ) or not ( $9.9 \pm 4.83$ ,  $N=42$ ) ( $t$ -test:  $t_{106}=1.51$ ,  $P=0.13$ ). Also, aggression did not differ between pairs of lowly fertile queens exposed to cold (60%,  $N=16$ ) or not (71%,  $N=21$ ) ( $\chi^2=0.13$ ,  $df=1$ ,  $P=0.72$ ). Finally, the discriminant analysis on cuticular profiles separated queens depending on their fertility status and we detected no difference between lowly fertile queens that were exposed or not to cold (Fig. 2). This indicates that the differences in behavioural patterns and cuticular profiles observed between lowly and highly fertile queens



**Figure 2.** Discriminant analysis of cuticular profiles of lowly and highly fertile queens. The circle red cross is the centroid of highly fertile queens and represents the typical signature of a high fertility status.

resulted from differences in fertility, not from cold. Overall, our results showed that queens used information about their own condition and their rivals' status to engage in aggression, thus providing support for the hypothesis that mutual assessment participated to their decision. Using a logistic regression, we then examined which factors best predicted focal queens' aggressiveness. We found no influence of lipid stores or head size on the likelihood to engage in aggression (Table 1). Fertility distances of queens were highly significant predictors of aggression: the probability of focal queens of behaving aggressively decreased with their chemical distance to highly fertile signature ( $\beta=-0.53\pm 0.22$ , odds-ratio [95% CI]: 0.59 [0.37, 0.88]), and reciprocally, the probability of stimulus queens of being attacked

**Table 1.** Binary logistic regression of the relative influence of lipid stores, size and chemical profiles of queens on the proportion of aggressive interactions.

Predictors	Deviance	<i>df</i>	Residual deviance	<i>P</i>
Size of focal queens	1.27	67	89.09	0.26
Size of stimulus queens	0.01	66	89.08	0.91
<b>Profiles of focal queens</b>	<b>9.65</b>	<b>65</b>	<b>79.43</b>	<b>0.002</b>
<b>Profiles of stimulus queens</b>	<b>7.39</b>	<b>64</b>	<b>72.03</b>	<b>0.007</b>
Lipid stores of focal queens	0.02	63	72.01	0.89
Lipid stores of stimulus queens	0.19	62	71.82	0.67
Size of focal queens X Size of stimulus queens	0.67	61	71.16	0.41
Profiles of focal queens X Profiles of stimulus queens	0.08	60	71.08	0.78
Lipid stores of focal queens X Lipid stores of stimulus queens	0.06	59	71.02	0.81
Size of focal queens X Profiles of stimulus queens	0.29	58	70.73	0.59
Size of focal queens X Lipid stores of stimulus queens	0.68	57	70.04	0.41
Size of stimulus queens X Profiles of focal queens	0.06	56	69.98	0.81
Size of stimulus queens X Lipid stores of focal queens	0.90	55	69.08	0.34
Profiles of focal queens X Lipid stores of stimulus queens	0.64	54	68.44	0.43
Profiles of stimulus queens X Lipid stores of focal queens	0.09	53	68.35	0.76

increased with their chemical distance to highly fertile signature ( $\beta=0.54\pm 0.25$ , odds-ratio [95% CI]: 1.72 [1.08, 2.95]).

In ants, the traditional view is that nestmate recognition involves a comparison between the chemical profile of an intruder and the internal representation of an individual's own odour, any mismatch leading to rejection (Blomquist and Bagnères, 2010). In this context, aggression in workers generally increases with chemical distance (Martin et al., 2012). If queens based their decision on an 'absolute value' of chemical distance, similar aggressiveness would have been predicted in pairwise contests involving lowly and highly fertile queens, irrespective of the actual fertility status of the focal and stimulus individuals. Such pattern was not found in our study where aggression differed markedly when lowly and highly fertile queens were tested as stimulus and focal individuals. This provides indirect lines of evidence that queens could use chemical cues and compare their fertility status to initiate aggression.

Our study provided additional support to earlier findings that hydrocarbons could be used as reproductive signals in *L. niger*. However, the putative compounds likely responsible for mutual assessment between queens were not the same as those experimentally identified previously (Holman et al. 2010a, b). One major difference concerns 3-MeC31 that was considered to advertise queen's quality but that was found here to only have a minor influence in comparison to other more explanatory compounds (Table S1). Such discrepancy opens interesting avenues for future research to increase our understanding of reproductive signalling in *L. niger* and, more generally, to investigate whether similar compounds play similar roles across contexts.

In pleometrotic associations, queens are usually unrelated and overt fighting is expected because they cannot gain inclusive fitness by ceding the contest (Cronin and Monnin, 2010). The fact that the cuticular profiles of queens are associated with their fertility and, possibly, with their decision to behave aggressively suggests that queens could use chemical signals advertising reproductive state to adopt strategies maximizing their fitness. Under an ultimate perspective, we can speculate that the onset of fights between queens differing in fertility results from reduced benefits of accepting lowly fertile individuals since they produce few or no brood but still represent a potential competitor during the elimination phase. Similar patterns were reported in wasps where individuals advertising high quality using visual signals were more likely to challenge rivals and individuals of low advertised quality were more likely to be aggressed (Tibbetts et al., 2010).

In conclusion, our study suggested that cuticular signatures conveying information about fertility status could be involved in mutual assessment. This opens interesting avenues for future research aiming at understanding how chemical cues contribute to the regulation of interactions between reproductives and, eventually, to queen selection in social insects.

**Acknowledgments.** We thank JB Ferdy, P d'Ettorre and members of IVEP group for useful suggestions. We thank referees for insightful comments on the manuscript.

**Data accessibility.** All data are deposited in the Dryad repository:  
<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.t1sg6>

## REFERENCES

- Aitchison, J. (1986). *The Statistical Analysis of Compositional Data*. London: Chapman and Hall.
- Arnott, G. and Elwood, R.W. (2009). Assessment of fighting ability in animal contests. *Anim. Behav.* 77, 991–1004.
- Aron, S., Steinhauer, N. and Fournier, D. (2009). Influence of queen phenotype, investment and maternity apportionment on the outcome of fights in cooperative foundations of the ant *Lasius niger*. *Anim. Behav.* 77, 1067–1074.
- Balas, M.T. and Adams, E.S. (1996). The dissolution of cooperative groups: mechanisms of queen mortality in incipient fire ant colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 38, 391–399.
- Bazazi, S., Arganda, S., Moreau, M., Jeanson, R., & Dussutour, A. (2016). Responses to nutritional challenges in ant colonies. *Anim Behav* 111, 235-249.
- Bernasconi, G. and Keller, L. (1996). Reproductive conflicts in cooperative associations of fire ant queens (*Solenopsis invicta*). *Proc. Biol. Soc. B* 263, 509–513.
- Bernasconi, G. and Keller, L. (1998) Phenotype and individual investment in cooperative foundress associations of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behav. Ecol.* 9, 478–485.
- Bernasconi, G. and Strassmann, J.E. (1999). Cooperation among unrelated individuals: the ant foundress case. *Trends Ecol. Evol.* 14, 477–482.
- Blomquist, G.J. (2010) Structure and analysis of insect hydrocarbons. In *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (ed. G.J. Blomquist and A.G. Bagnères), pp 19-34. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Blomquist, G.J. and Bagnères, A.G. (2010). *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Cronin, A.L. and Monnin, T. (2009) Bourgeois queens and high stakes games in the ant *Aphaenogaster senilis*. *Front Zool* 6, 24.
- Cronin, A.L. and Monnin, T. (2010) Self-sacrifice in 'desperado' contests between relatives. *Front Zool* 7, 27.
- Goubault, M., Batchelor, T.P., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J. and Hardy, I. (2006). Volatile emission by contest losers revealed by real-time chemical analysis. *Proc. R. Soc. B* 273, 2853–2859.
- Hardy, I. and Briffa, M. (2013). *Animal Contests*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

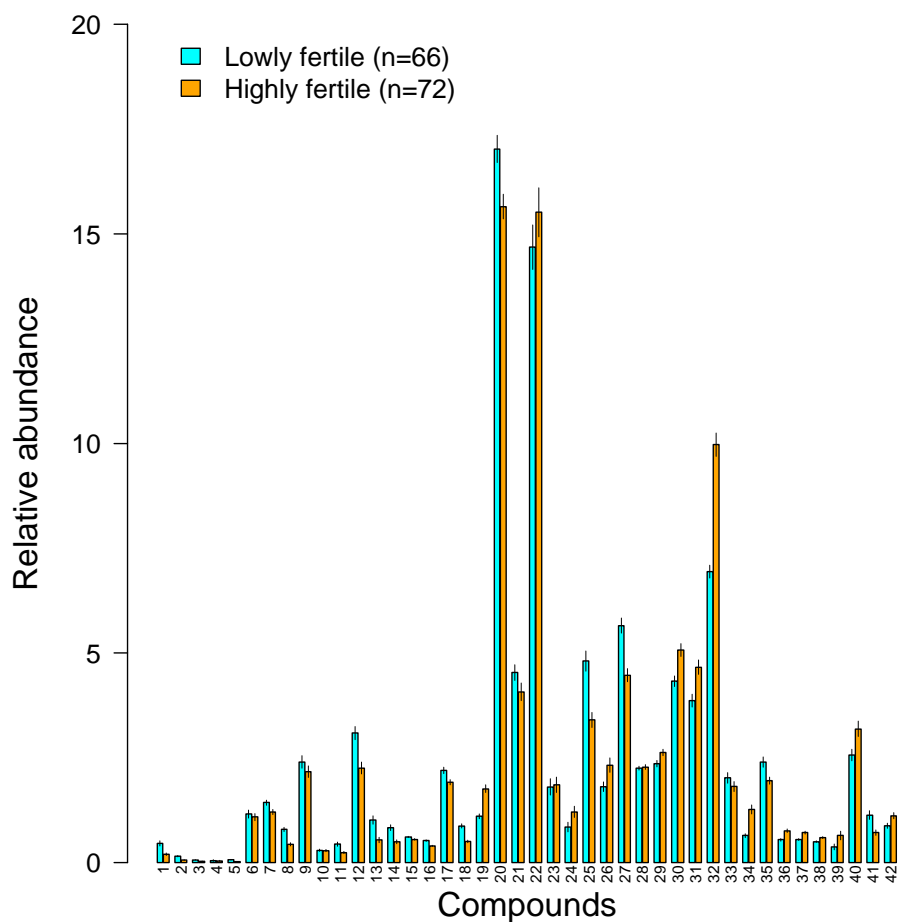
- Hervé, M. (2014). RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions. URL: <http://cran.r-project.org/package=RVAideMemoire>.
- Holman, L., Dreier, S. and d’Ettorre, P. (2010a). Selfish strategies and honest signalling: reproductive conflicts in ant queen associations. *Proc. Biol. Soc. B* 277, 2007–2015.
- Holman, L., Jorgensen, C.G., Nielsen, J. and d’Ettorre, P. (2010b). Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proc. Biol. Soc. B* 277, 2793–3800.
- Holman, L., Leroy, C., Jorgensen, C., Nielsen, J. and d’Ettorre, P. (2013). Are queen ants inhibited by their own pheromone? Regulation of productivity via negative feedback. *Behav. Ecol.* 24, 380-285.
- Liebig, J. (2010) Hydrocarbon profiles indicate fertility and dominance status in ant, bee, and wasp colonies. In *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (ed. G.J. Blomquist and A.G. Bagnères), pp 254-281. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Martin, S.J., Vitikainen, E., Drijfhout, F.P. and Jackson, D. (2012). Conspecific ant aggression is correlated with chemical distance, but not with genetic or spatial distance. *Behav. Genet.* 42, 323–331.
- Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann Zool Fenn* 43, 515–530.
- R Development Core Team. (2015). A language and environment for statistical computing. URL <http://www.R-project.org/>.
- Sommer, K. and Hölldobler, B. (1995). Colony founding by queen association and determinants of reduction in queen number in the ant *Lasius niger*. *Anim. Behav.* 50, 287–294.
- Tibbetts, E., Mettler, A. and Levy, S. (2010). Mutual assessment via visual status signals in *Polistes dominulus* wasps. *Biol. Lett.* 6, 10–13.
- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

**Table S1. Compounds in the cuticular extracts of queens.** VIP (Variable Importance in Projection) scores (1st and 2nd component) of each compound on each component of the discriminant analysis (PLS-DA). Compounds highlighted in bold were retained in the analysis (a VIP score >1 denotes a highly influential compound in the discrimination between lowly and highly fertile queens). KI: Kovat's index.

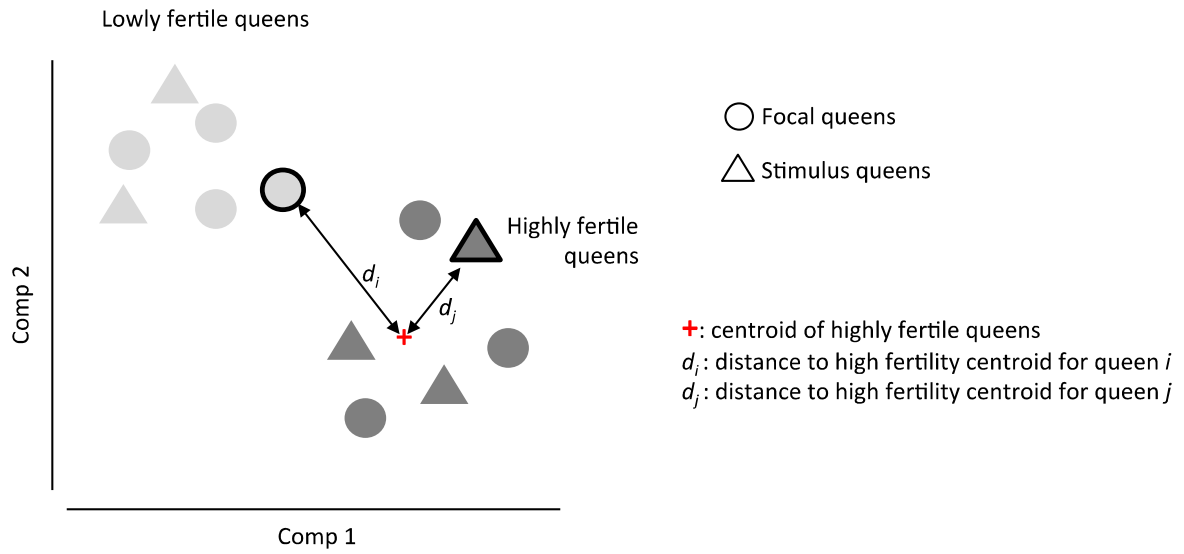
Peak	Compound	KI	VIP Score	
			Comp.1	Comp.2
1	n-C27	2695	<b>1.52</b>	<b>1.44</b>
2	3-MeC27	2769	<b>1.86</b>	<b>1.75</b>
3	5,9-diMeC27	2777	<b>1.45</b>	<b>1.4</b>
4	n-C28	2794	0.04	0.36
5	5,9-diMeC28	2875	<b>2.06</b>	<b>1.97</b>
6	n-C29	2895	0.32	0.55
7	7-/ 9-/ 11-/ 13- and 15-MeC <sub>29</sub>	2926	0.12	0.15
8	11-MeC <sub>29</sub>	2946	<b>1.41</b>	<b>1.33</b>
9	7,11-/ 9,15- and 11,15-diMeC <sub>29</sub>	2959	0.12	0.48
10	7-MeC <sub>29</sub>	2964	0.21	0.2
11	3-MeC <sub>29</sub>	2969	0.75	0.73
12	5,15-diMeC <sub>29</sub>	2975	0.63	0.6
13	x,15-diMeC <sub>29</sub>	2987	0.91	0.89
14	n-C30	3002	<b>1.11</b>	<b>1.05</b>
15	12,14-diMeC30	3025	0.33	0.32
16	12,14-diMeC30	3029	0.54	0.65
17	10,14-diMeC30	3055	0.18	0.57
18	C31:1	3074	<b>1.47</b>	<b>1.41</b>
19	n-C31	3095	<b>2.16</b>	<b>2.09</b>
20	9-/ 11-/ 13- and 15-MeC <sub>31</sub>	3127	0.45	0.61
21	9,x-diMeC <sub>31</sub>	3152	0.29	0.27
22	7,17-/ 9,15-/ 9,17-/ 11,15- and 13,17-diMeC <sub>31</sub>	3160	0.72	0.85
23	7-MeC <sub>31</sub>	3164	0.1	0.32
24	3-MeC <sub>31</sub>	3171	0.9	0.96
25	5,13- and 5,17-diMeC <sub>31</sub>	3176	0.59	0.56
26	7,13,17-triMeC <sub>31</sub>	3189	0.7	0.75
27	3,9-/ 3,11-/ 3,13-/ 3,15- and 3,19-diMeC <sub>31</sub>	3200	0.47	0.62
28	10-/ 14- and 15-MeC <sub>32</sub>	3224	<b>1.11</b>	<b>1.17</b>
29	4-MeC <sub>32</sub> and 10,14-diMeC <sub>32</sub>	3253	<b>1.39</b>	<b>1.41</b>
30	7-/ 9-/ 11-/ 13-/ 15-/ 17- and 19-	3326	<b>1.43</b>	<b>1.42</b>

31	MeC <sub>33</sub> 11,15-/ 13,17- and 15,19- diMeC <sub>33</sub>	3352	0.65	0.64
32	9,15- and 11,17- diMeC <sub>33</sub>	3357	<b>2</b>	<b>1.89</b>
33	5,13- 5,17- diMeC <sub>33</sub>	3373	0.04	0.18
34	2-MeC <sub>33</sub>	3386	0.78	0.74
35	n-C <sub>34</sub>	3399	0.1	0.58
36	17-MeC <sub>34</sub>	3422	1.02	0.98
37	10-MeC <sub>34</sub>	3453	0.89	0.97
38	13-MeC <sub>35</sub>	3523	0.68	0.88
39	12-MeC <sub>35</sub>	3548	0.03	0.12
40	9-/ 11-MeC <sub>35</sub>	3555	0.88	0.88
41	13,x-diMeC <sub>35</sub>	3566	0.51	0.5
42	9-/ 11-MeC <sub>37</sub>	3749	<b>1.05</b>	<b>1</b>



**Figure S1.** Relative abundance (mean  $\pm$  SE) of hydrocarbons for lowly and highly fertile queens. The identity of each compound is reported in Table S1.





**Figure S2.** Schematic explanation of how the distance of each queen to high fertility signature was determined. The distance  $d_i$  is the distance of the focal queen  $i$  to the centroid of highly fertile queens and the distance  $d_j$  is the distance of the stimulus queen  $j$  to the centroid of highly fertile queens.



# CHAPITRE 5

## RÉSUMÉ

Chez les fourmis, il est largement admis que la perception des lipides cuticulaires participe à la régulation des interactions sociales entre castes et au sein des castes. Dans le chapitre précédent, nous avons proposé que la modulation des interactions sociales entre reines fondatrices pourrait dépendre de la perception de composés cuticulaires signalant leur état de fertilité.

L'objectif de ce chapitre est de caractériser les capacités de perception des reines de *L. niger* aux composés cuticulaires. Nous avons développé une approche d'antenneoélectrographie couplée à la chromatographie en phase gazeuse afin de mesurer l'activité électrique des antennes suite à la présentation des composés du profil cuticulaire des reines. Les résultats de ces travaux sont peu informatifs en raison de la faible intensité des signaux enregistrés et de l'extrême variabilité des réponses obtenues.

**Perception of queens' cuticular profile by a queen's antennae: a test of GC-EAD recordings with *Lasius niger* founding queen ants**

Kévin BERTHELOT<sup>1</sup>, Raphaël JEANSON<sup>1</sup> and Manfred AYASSE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

<sup>2</sup>Chemical Ecology Group, Institute of Evolutionary Ecology and Conservation Genomics (Biologie III), University of Ulm, Germany

## ABSTRACT

In the ant *Lasius niger*, young queens can associate to found new colonies but the cooperation ceases when the first workers hatch from their cocoons and queens engage in lethal fights. Only one queen survives and monopolizes reproduction. Earlier work showed that group-founding queens can adjust their egg laying rate as a function of the number of co-foundresses and their relative body mass. Although the mechanisms associated to the loss of cooperation in pleometrotic associations received attention, behavioural rules used by queens to initiate fighting are still poorly understood. In *Lasius niger*, queens can signal their reproductive state to workers via the production of specific cuticular hydrocarbons that act as primer pheromones inhibiting the ovarian development in workers. In addition, the same pheromonal bouquet induced self-inhibition of egg-laying in queens. This mechanism is believed to provide a negative feedback allowing queens to regulate their oviposition rate. These findings indicate that queens can be impacted by queen-produced pheromones. In this work we investigated the ability of queens to perceive fertility signals produced by other queens. We used Gas Chromatography coupled with ElectroAntennographic Detection (GC-EAD) to record the response of a founding queen's antenna to founding queen's cuticular hydrocarbons. Unfortunately, we did not succeed in recording consistent responses from antenna and we obtained very weak signals.

## INTRODUCTION

Communication in insects heavily relies on olfaction. Some species evolved impressive organs to perceive the semio-chemicals produced by conspecifics. In moths for instance, the male has prominent antennae to detect female's pheromones and can detect very small concentrations that are processed by a male-specific brain structure, the macroglomerular complex (Matsumoto & Hildebrand 1981). The chemosensory apparatus of males is very sensitive and responds within millisecond timescale to tiny variations in the pheromonal gradient induced by the stochastic movements of airflow (Vickers et al. 2001). After processing the pheromone, the male displays a peculiar upwind flight to trace female's location and mate (Cardé & Mafra-Neto 1997). In solitary insects, chemical communication between conspecifics is generally limited to mating. This markedly contrasts with social insects where chemical communication plays a crucial role in social organization and is involved in several contexts including, for instance, nestmate recognition or collective foraging (Wyatt 2003). In social insects, communication notably relies on the production of cuticular hydrocarbons, which are present in the most external layer of the cuticle, and that primarily protect individuals from desiccation (Lockey 1980, Bagnères & Blomquist 2010).

The olfactory system of insects can roughly be divided in two parts: the peripheral chemosensory apparatus found in the antenna and the integrating centers located in the brain. Each antenna contains several categories of sensory units, the sensilla, that are involved in different sensorial modalities including mechano-reception, hygro-reception, gustative and chemical reception (McIver 1975). In ants, two types of sensilla, *basiconica* and *trichodea*, have a multi-porous structure allowing the uptake of chemicals present in the environment and they are considered to act as chemoreceptors. Each sensilla comprises dozens to hundreds of dendrites expressing different types of olfactory receptors (OR) that are specific to families of odorants (Hallem et coll. 2006). The axons of olfactory neurons form two olfactory tracts that project to olfactory lobes in the brain. The olfactory information is then processed through a network of interneurons and projection neurons that emit axons to higher brain centers for further processing and integration. The *basiconica* sensilla are good candidates for processing the social information conveyed by certain cuticular hydrocarbons (Nishikawa et al. 2012, Sharma et al. 2015).

The ability of colony members to detect the presence of a functional reproductive is an important trait shaping social organization in ant colonies. Indeed, an efficient reproductive division of work requires queens to signal their fertility to workers. The advertisement of

fertility involves specific cuticular hydrocarbons produced by queens and perceived by workers (Monnin 2006, Liebig 2010, Van Oystaeyen et al. 2014). In the ant *Lasius niger* for instance, fertile queens produce large amounts of one cuticular hydrocarbon, the 3-methylhentriacontane (3-MeC<sub>31</sub>) that is perceived by workers' antennae and that inhibits their ovarian development. This represents one of the few studies that directly test the response of workers to a putative fertility pheromone emitted by queens in ants. Indeed, several studies evidenced differences in the cuticular profiles between reproductive and non-reproductive individuals but relatively few work investigated whether workers can perceive these compounds. In addition, the sensitivity of the queens themselves has been largely overlooked. This is however an important question, if one wants to understand the regulation of social interactions between reproductives, and possibly the evolution of multi-queens societies in social insects.

Indeed, the breeding system in ants is characterized by the recurrent occurrence of obligate multiple-queen colonies in comparison to other social Hymenoptera (Boomsma et al. 2014, Boulay et al. 2014). Multiple-queen associations follow a continuum ranging from species sharing evenly reproduction to species where reproduction is skewed between females leading eventually to functional monogyny (i.e. several queens are mated but one produces most brood that develop into adult females) (Bourke & Franks 1995). The partitioning of reproduction between females can result from direct aggression (Ortius & Heinze 1999) or egg cannibalism (policing, Monnin & Peeters 1997, Kikuta & Tsuji 1999). Ortius & Heinze (1999) showed that queens in the polygynous ant *Leptothorax* sp. usually fight over the reproductive function after hibernation unless one of them is allowed to develop her ovaries before her contestants. In this case, the more fertile queen occupies peacefully the  $\alpha$ -rank in the reproductive hierarchy and produces most of the brood. This suggests that queens can not only signal their fertility status but that other queens can perceive these signals and adjust their own reproductive share accordingly.

In the ant *L. niger*, queens can associate during foundation (Sommer & Hölldobler 1995). The initial cooperation between queens observed during the incipient stages of colony foundation ceases when the first workers emerge from their cocoons. At this time, queens engage in lethal fights and all but one queen perishes. Holman et al. (2010a) demonstrated that queens winning fights produce larger amounts of specific compounds than their dead competitors. Among these compounds, the 3-MeC<sub>31</sub> signals queens' productivity and prevents workers from reproducing (Holman et al. 2010b). In a subsequent study, these



authors also showed that 3-MeC<sub>31</sub> slightly depress egg-laying activity in queens (Holman et al. 2012).

In the previous chapter we proposed that mutual assessment based on chemical signals can explain the behavioral patterns observed between queens differing in fertility status. We identified several compounds that accurately predicted the level of aggression observed in pairwise encounters. To go further in our understanding of the underlying mechanisms, we aimed at testing the perceptive abilities of queens by examining whether queens' antennae are effectively sensitive to these hydrocarbons. A response of queens to such compounds would bring support to our hypothesis that reproductives can use chemical cues to assess the fertility status of rival queens and adjust their aggressive response accordingly.

Electroantennography represents one relevant approach to investigate perceptive abilities in insects. The antenna is cut off and mounted between two electrodes while a specific device pulses an airstream enriched with odorants. The antenna remains alive several hours and sensilla can respond to the active compounds for which they are tuned. The overall response of all sensilla activated by the odorant produces an increase in the intensity of the amplified electric signal. This technique can be coupled with Gas Chromatography (GC) to test blends of compounds such as cuticular profiles. The whole cuticular profile of an insect is injected into the chromatograph, one half is detected by the chromatograph's detector and the other half is pulsed into a glass pipe within a humidified airstream that goes directly to the antenna. This technique allows stimulating sequentially the antenna with each compound of the profile. By recording the response of the antenna for each compound, it is possible to identify which molecules specifically trigger a response. This technique called GC-EAD (Gas Chromatography with Electro-Antennography Detection) has been rarely used in ants. GC-EAD is a qualitative technique that only permits to determine to which compound(s) in the chemical blend the antenna is sensitive but it cannot be used to develop quantitative approach to determine how the antenna responds to different quantities of the same compound. To our knowledge, only one study, performed in the *Neoponera* (formerly *Pachycondyla*) *inversa*, used this approach to test the response of worker's antennae to the cuticular profile of queens (d'Ettorre et al. 2004). The authors elegantly showed that the antennae respond strongly to one compound in the queen's profile (3,11-dimethylheptacosane, 3,11-diMeC<sub>27</sub>), which concentration is correlated with her fertility. It is important to note that GC-EAD is a qualitative method (presence or absence of response to cuticular compounds). Despite this

limitation, GC-EAD is relevant to explore the sensitivity of antennae to cuticular compounds and it thus represents a first step to identify candidate compounds perceived by queens.

In this context, the main objective of the present study was to use GC-EAD to investigate how queens responded to fertility signals depending on their own status of fertility in the ant *L. niger*. Because GC-EAD is not available in Toulouse, I applied for a research grant to collaborate with Pr Ayasse (Ulm University, Germany), who is an internationally recognized expert in chemical ecology in insects. We first tested the reaction of workers' antennae to workers' and queens' profiles to confirm that we were also able to detect a response of workers to queens' compounds as demonstrated in Holman et al. (2010b). We next explored the response of lowly fertile founding queens to the chemical signature of highly fertile founding queens. Unfortunately, we were not able to test the response of highly fertile queens because of the too short duration of my stay (8 weeks) in Germany.

## **MATERIALS & METHODS**

### *Ant collection and housing*

Founding queens of *Lasius niger* were collected after their nuptial flight on July 2015. For this study, we tested lowly fertile queens (N=11) than were maintained in the cooled incubator at 5°C until the beginning of the experiment (November 2015) (for details see Chapter 3). We used the cuticular extracts of highly fertile queens that were sacrificed after the completion of the experiments described in the previous chapter. We also aimed at testing workers from mature colonies (not minim workers produced by founding queens). We thus collected large queenright colonies of *L. niger* at Marquefave (43°18' N, 1°15' E, Haute-Garonne, France) in October 2015. In the laboratory, colonies were maintained in large plastic box which walls were coated with Fluon<sup>®</sup> to prevent ants from escaping. Ants were fed three times a week with artificial food (Bhatkar and Whitcomb 1970).

### *Preparation of extracts of queens and workers*

Queens' bodies were individually introduced into a 2ml vial and soaked in 0.25 ml of pentane (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany) for 10 minutes. The extract was transferred into a 2 ml vial and evaporated under a gentle nitrogen stream (see Chapter 3). To increase the concentration of cuticular hydrocarbons used to stimulate antennae, we pooled the extracts of six queens into a 2 ml vial. Cuticular profiles of workers were obtained by soaking 30 individuals in 0.25

ml of pentane during 3 minutes. Both queens' and workers' extracts were gently evaporated under nitrogen stream until we obtained 30µl solutions.

*Detection of cuticular hydrocarbons using GC-EAD*

A HP6890 gas chromatograph (Hewlett-Packard) equipped with a DB5-MS column (30 x 0.32 mm inner diameter, 0.25 µm film, J&W Scientific, Folsom, Ca, USA) was used. Helium was the carrier gas. Temperature increased from 50 to 310°C at 10°C.min<sup>-1</sup>. A splitter (split ratio 1:1) conveyed the extract into the GC outlet. The outgoing extract was directed towards a glass pipe (Ø = 1cm, 10cm) carrying a purified and humidified airstream. The extract was blown directly on the excised antenna. The subject's antenna was carefully excised and the tip of the antenna was quickly cut off. The antenna was mounted between two glass electrodes filled with insect Ringer solution. The antenna's base was connected to a grounded Ag – AgCl wire whereas the antenna's tip was connected via an interface box (i.e. an amplifier) to a signal acquisition device (IDAC; Synthec, Hilversum, The Netherlands) for signal transfer to a PC. The flame ionisation detector and the EAD signals were recorded simultaneously using GCEAD 2014 software. A total of 109 and 86 compounds observed consistently in queens' and workers' cuticular profiles (respectively) were used in the analysis. We identified the major cuticular hydrocarbons using their retention indices and on the basis of previous studies (Lenoir et al. 2009, Drier & d'Ettorre 2009) (Table S1). We tested each antenna as many times as possible. Because the antenna contains mechano-sensorial sensilla, we blew an air puff between chemical stimulations to ensure that the antenna was still responding and alive. In total, 41 antennae of workers (50 runs) were tested with workers' extracts. We tested 6 antennae of workers (12 runs) and 11 antennae of queens (34 runs) with fertile queens' extracts.

*Data analysis*

Runs were analysed using GC-EAD 2014 by visual inspection. We searched for EAD peaks that were consistently present in several runs for the same antenna and between different antennae. To remove the baseline noise, the different runs using the same extract were rescaled and then pooled. For each extract, we obtained an averaged FID and an averaged corresponding EAD. Averaged signals were obtained using R 3.2.1 (R Development Core Team 2015).

## RESULTS

### *Response of worker's antenna to workers' extract*

When testing workers' antennae to workers' extracts, we obtained a weak response for 6 peaks among which one was unidentified. Workers' antenna apparently responded to nonacosane (C<sub>29</sub>; 7 responses out of 50 runs), a mix of methylnonacosane (x-,y-MeC<sub>29</sub>; 7 responses out of 50 runs), 5-methylnonacosane (5-MeC<sub>29</sub>; 9 responses out of 50 runs; see Figure 1), 5,15-dimethylnonacosane (5,15-diMeC<sub>29</sub>; 6 responses out of 50 runs), an unknown methylated alkane of 31 carbons (10 responses out of 50 runs) and 3-methylhentriacontane (3-MeC<sub>31</sub>; 6 responses out of 50 runs).

### *Response of worker's antenna to highly fertile founding queens' extract*

When we tested the response of workers' antennae to queens' extract, we obtained a weak response for 3 peaks. One unknown compound of 33 carbons triggered a response in 2 out of 12 runs. The two other compounds triggered a response in 3 out of 12 runs. Although the identity of these two compounds remains to be confirmed, we suspect that they were the same compounds that triggered a response in workers' profile (5,15-diMeC<sub>29</sub> and the unknown compound with 31 carbons).

### *Response of lowly fertile queen's antenna to highly fertile queens' extract*

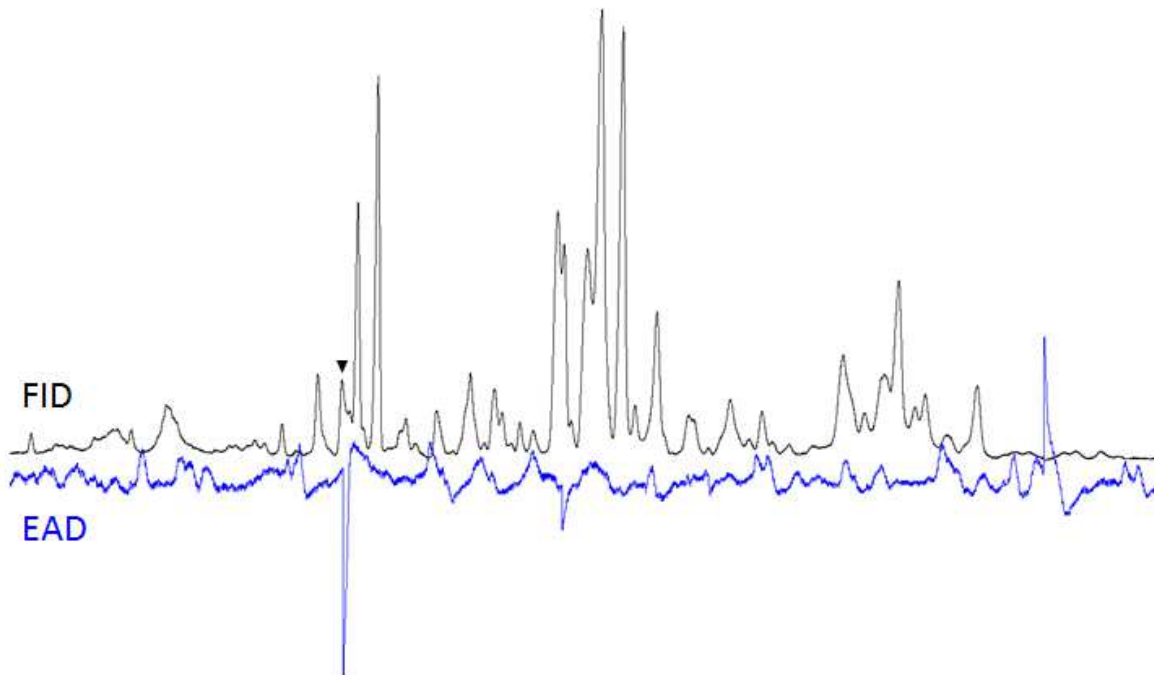
We finally tested the response of queens' antennae to queens' extract. We obtained a weak response for 10 peaks. Queens responded to 7 small peaks that could not be identified. Queens' antennae also responded to 5,15-dimethylheptacosane (5,15-diMeC<sub>27</sub>; 3 responses out of 34 runs), nonacosane (C<sub>29</sub>; 4 responses out of 34 runs) and 5,15-dimethyltrtriacontane (5,15-diMeC<sub>33</sub>; 3 responses out of 34 runs) (Figure 2).

## DISCUSSION

We did not manage to obtain repeatable and consistent responses within castes and most of responses were of weak amplitude. Overall, workers' and queens' antennae responded to 6 and 10 compounds, respectively. The antennae of workers and queens responded to nonacosane and also to two dimethylalkanes differing in chain length (C<sub>29</sub> vs. C<sub>33</sub>). The antennae of workers reacted to 3-methylhentriacontane (3-MeC<sub>31</sub>) from workers' extract but not from queens' extract. The low sample size (6 antennae for this condition) is one possible

reason that might explain this discrepancy. Using EAD, Holman et al. (2010b) were able to use synthetic 3-MeC<sub>31</sub> and such approach probably improved the quality of workers' response. Additionally, we observed no consistent responses of queens to 3-MeC<sub>31</sub> although this compound correlates with queens' fertility (Holman et al. 2010a) and inhibits both on workers' and queens' ovarian development (Holman et al. 2010a, 2012). It is worth stressing that queens can use different signals than workers to assess fertility status (Smith et al. 2011). Whether this also applies to *L. niger* awaits investigation. In any case, none of the cuticular hydrocarbons identified in the previous chapter as putative compounds potentially involved in mutual assessment in queens triggered response in queens' antenna. However, GC-EAD is a difficult technique and it often requires weeks or months to optimise the optimal operative conditions, which strongly vary between species. We list below some factors that could be improved and/or explain the lack of results.

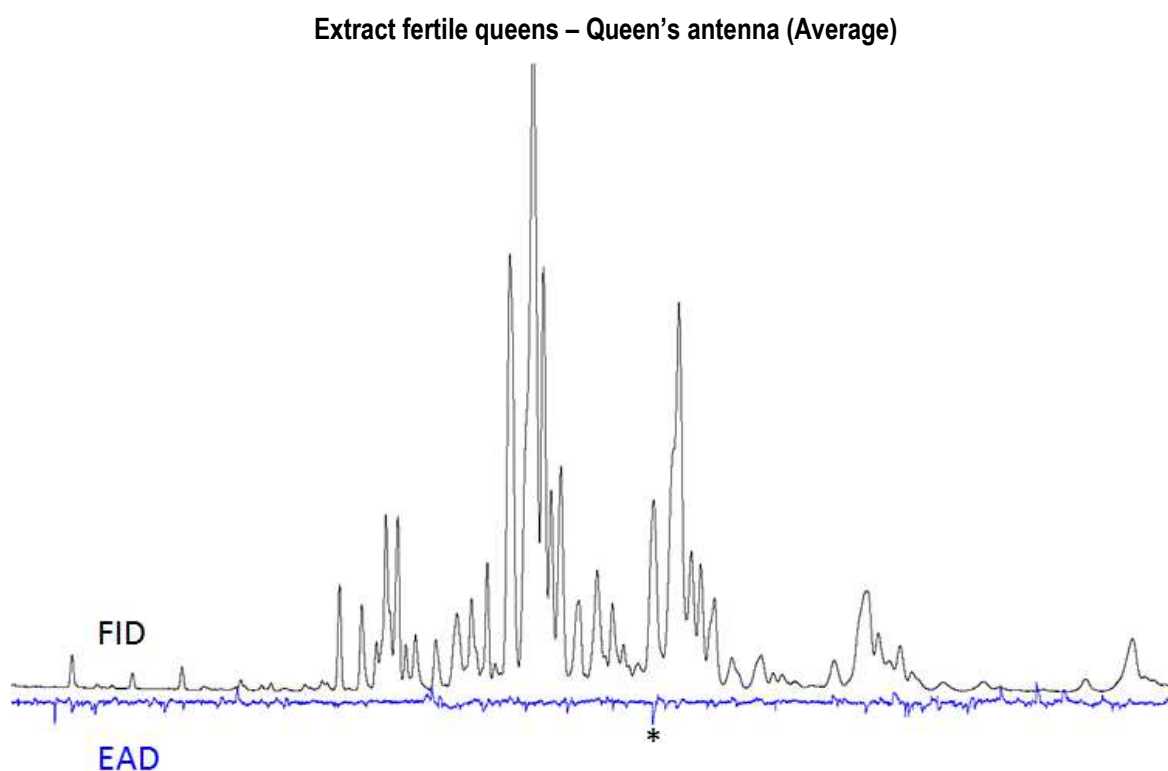
**Extract 30 workers – Worker's antenna**



**Figure 1.** Response of a worker's antenna to a workers' extract. The black line (FID) represents the detection of cuticular hydrocarbons by the chromatograph. The blue line (EAD) is the response of the tested antenna to the extract. The black arrow indicates the 5-methylnonacosane (5-MeC<sub>29</sub>), which triggers a strong response in the antenna of this tested worker.

One advantage of GC-EAD is that complex blends of compounds can be tested without the need of synthesizing or purchasing hydrocarbons. One drawback however is that, depending on the temperature programme used to volatilise hydrocarbons, compounds with close retention times come out from the chromatograph at the same time and reaches the antenna simultaneously. The temporal resolution of stimulation may not be satisfactory and can lead to inconsistent conclusions. Another potential issue relates to the quantity of chemicals reaching the antenna. The displacement of compounds in the column of the chromatograph requires high temperatures (up to 300°C) to volatilise chemicals. The drastic diminution of temperature at the end of the column can induce a condensation of the heavier compounds in the glass pipe and such compounds cannot reach the antenna, or in very low quantity. In *L. niger*, heavy hydrocarbons (>30 carbons) represent about 50 % of cuticular profiles. Finally, the preparation the antenna represents one of the most critical step of GC-EAD. Mounting antenna between two glass electrodes requires cutting and bathing the tip of the antenna in a Ringer solution. However, the *basiconica* sensilla, which are sensitive to hydrocarbons (Ozaki et al. 2005), are highly concentrated at the most distal segments of the antenna (Renthal et al. 2003, Nakanishi et al. 2009 and Mysore et al. 2010).

In conclusion, we did not succeed in recording consistent responses to cuticular compounds in workers and queens and we should think of alternative methods in the future. The identifying the cuticular compounds perceived by queens is necessary to deploy bioassays to directly test our hypotheses of mutual assessment in founding queens. We believe that this issue still deserves attention and that this would increase our understanding of the mechanisms involved in the regulation of social interactions between reproductives in ants.



**Figure 2.** Averaged response of queens’ antennae to a queens’ extract. The black line (FID) represents the detection of cuticular hydrocarbons by the chromatograph. The blue line (EAD) is the averaged response (N=34) of the tested antennae to the same extract. The black star indicates a peak that could erroneously be interpreted as a response but this was baseline noise and it was not repeated for different runs. The EAD line shows no response of queens’ antennae.

## REFERENCES

- Bhatkar, A., & Whitcomb, W. H. (1970). Artificial diet for rearing various species of ants. *Florida Entomological Society*, 53(4), 229–232.
- Blomquist, G. J., & Bagnères, A.-G. (2010). *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. (G. J. Blomquist & A.-G. Bagnères, Eds.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Boomsma, J. J., Huszár, D. B., & Pedersen, J. S. (2014). The evolution of multiqueen breeding in eusocial lineages with permanent physically differentiated castes. *Animal Behaviour*, 92, 241–252.
- Boulay, R., Arnan, X., Cerdá, X., & Retana, J. (2014). The ecological benefits of larger colony size may promote polygyny in ants. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(12), 2856–2863.
- Bourke, A. F. G., & Franks, N. R. (1995). *Social Evolution in Ants*. (J. R. Krebs & T. Clutton-Brock, Eds.). Chichester, West Sussex: Princeton University Press.
- Cardé, R. T., & Mafra-Neto, A. (1997). Mechanisms of Flight of Male Moths to Pheromone. In *Insect Pheromone Research*. (R. T. Cardé & A. K. Minks, Eds.). Springer. (pp. 275–291).
- d’Ettorre, P. (2004). Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbon signal in the ant *Pachycondyla inversa*. *Journal of Experimental Biology*, 207(7), 1085–1091.
- Hallem, E. A., Dahanukar, A., & Carlson, J. R. (2006). Insect odor and taste receptors. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 113–135.
- Holman, L., Dreier, S., & d’Ettorre, P. (2010). Selfish strategies and honest signalling: reproductive conflicts in ant queen associations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1690), 2007–2015.



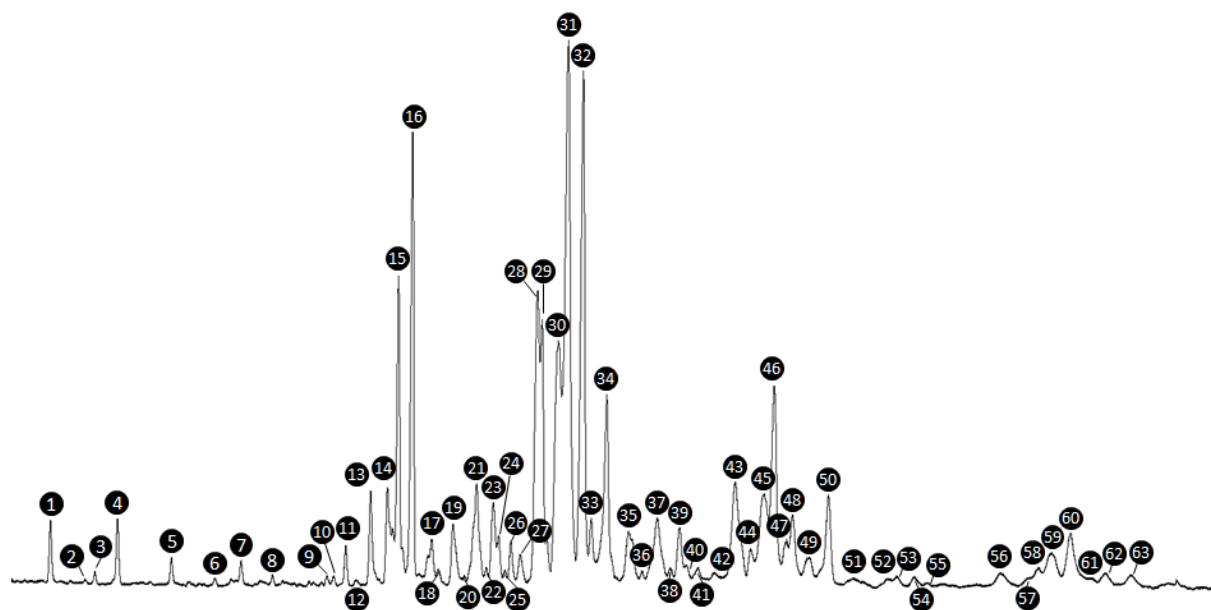
- Holman, L., Jorgensen, C. G., Nielsen, J., & d’Ettorre, P. (2010). Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1701), 3793–3800.
- Holman, L., Leroy, C., Jorgensen, C., Nielsen, J., & d’Ettorre, P. (2013). Are queen ants inhibited by their own pheromone? Regulation of productivity via negative feedback. *Behavioral Ecology*, 24(2), 380–385.
- Kikuta, N., & Tsuji, K. (1999). Queen and worker policing in the monogynous and monandrous ant, *Diacamma* sp. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46(3), 180–189.
- Lenoir, A., Depickère, S., Devers, S., Christidès, J.-P., & Detrain, C. (2009). Hydrocarbons in the ant *Lasius niger*: from the cuticle to the nest and home range marking. *Journal of Chemical Ecology*, 35(8), 913–921.
- Liebig, J. (2010). Hydrocarbon profiles indicate fertility and dominance status in ant, bee, and wasp colonies. In *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. (G. J. Blomquist & A.-G. Bagnères, Eds.). Cambridge: Cambridge University Press. (pp. 254–282)
- Lockey, K. H. (1980). Insect cuticular hydrocarbons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 65(3), 457–462.
- Matsumoto, S. G., & Hildebrand, J. G. (1981). Olfactory mechanisms in the moth *Manduca sexta*: response characteristics and morphology of central neurons in the antennal lobes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 213(1192), 249–277.
- McIver, S. B. (1975). Structure of cuticular mechanoreceptors of arthropods. *Annual Review of Entomology*, 20(1), 381–397.
- Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Annales Zoologici Fennici*, 43(5–6), 515–530.
- Monnin, T., & Peeters, C. (1997). Cannibalism of subordinates’ eggs in the monogynous queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *Naturwissenschaften*, 84(11), 499–502.

- Mysore, K., Shyamala, B. V., & Rodrigues, V. (2010). Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus compressus* (Fabricius, 1787). *Arthropod Structure & Development*, 39(5), 310–321.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., & Nishikawa, M. (2009). Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell and Tissue Research*, 338(1), 79–97.
- Nishikawa, M., Watanabe, H., & Yokohari, F. (2012). Higher brain centers for social tasks in worker ants, *Camponotus japonicus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(7), 1584–1598.
- Ozaki, M. (2005). Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*, 309(5732), 311–314.
- R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Renthal, R., Velasquez, D., Olmos, D., Hampton, J., & Wergin, W. P. (2003). Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*, 34(8), 405–413.
- Sharma, K. R., Enzmann, B. L., Schmidt, Y., Moore, D., Jones, G. R., Parker, J., Berger, S.L., Reinberg, D., Zwiebel, L. J., Breit, B., Liebig, J., & Ray, A. (2015). Cuticular hydrocarbon pheromones for social behavior and their coding in the ant antenna. *Cell Reports*, 12(8), 1261–71
- Sommer, K., & Hölldobler, B. (1995). Colony founding by queen association and determinants of reduction in queen number in the ant *Lasius niger*. *Animal Behaviour*, 50(2), 287–294.
- Van Oystaeyen, A., Oliveira, R. C., Holman, L., van Zweden, J. S., Romero, C., Oi, C. A., d'Ettorre, P., Mohammadreza, K., Billen, J., Wackers, F., & Wenseleers, T. (2014). Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. *Science*, 343(6168), 287–290.

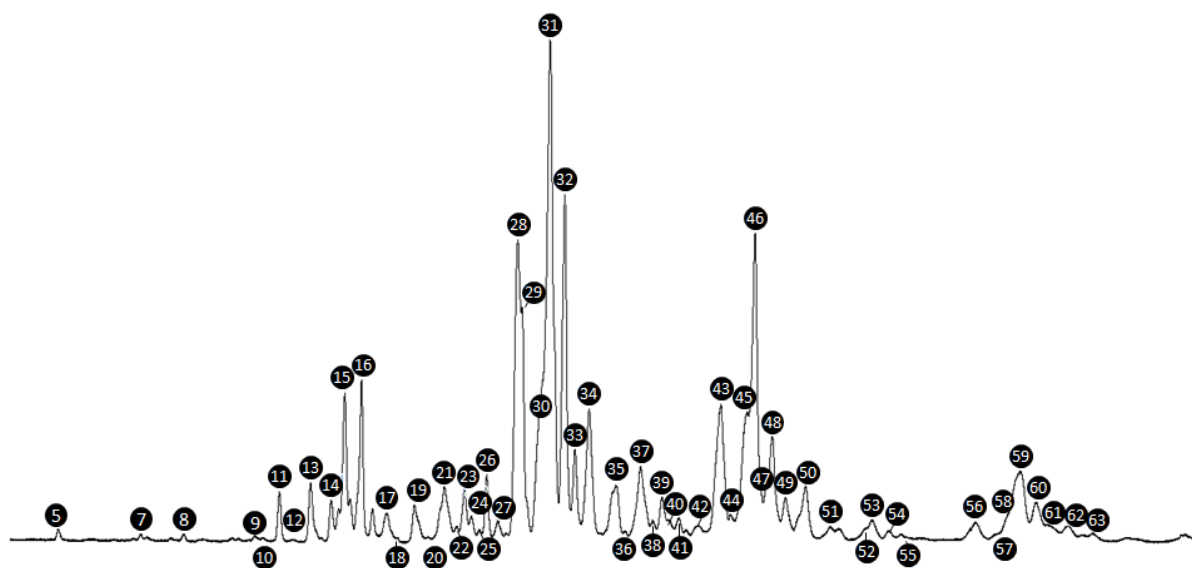
Vickers, N. J., Christensen, T. A., Baker, T. C., & Hildebrand, J. G. (2001). Odour-plume dynamics influence the brain's olfactory code. *Nature*, *410*(6827), 466–470.

Wyatt, T. D. (2003). *Pheromones and Animal Behaviour - Communication by Smell and Taste*. (T. D. Wyatt, Ed.). Cambridge: Cambridge University Press.

Appendices



**Figure S1.** Cuticular profile of workers of the ant *Lasius niger* (N=30 workers). Compounds are identified in Table S1.



**Figure S2.** Cuticular profile of fertile founding queens of the ant *Lasius niger* (N=6 queens). Compounds are identified in Table S1.

**Table S1.** Cuticular hydrocarbons present on the cuticle of workers and queens of the ant *Lasius niger* and responses triggered by each compound in antenna of individuals from those two castes. Queens' and workers' cuticular extracts contained the same compounds in different proportions. In bold are indicated the compounds that triggered repeatedly a response in different workers' or queens' antennae. x,y: undetermined methyl positions (note that x and y positions differ between compounds).

Peak	Compound	Antenna response	
		Workers	Queens
1	3-MeC <sub>25</sub>	0	0
2	unknown	2	<b>4</b>
3	unknown	2	<b>3</b>
4	n-C <sub>27</sub>	3	0
5	5,15-diMeC <sub>27</sub>	0	<b>3</b>
6	unknown	2	0
7	unknown	2	2
8	unknown	3	0
9	unknown	4	<b>3</b>
10	unknown	4	1
11	n-C <sub>29</sub>	<b>7</b>	<b>4</b>
12	unknown	4	0
13	11-/15-MeC <sub>29</sub>	<b>6</b>	0
14	5-MeC <sub>29</sub>	<b>9</b>	2
15	9,11-/9,13-/9,15-diMeC <sub>29</sub>	<b>5</b>	0
16	5,15-diMeC <sub>29</sub>	<b>6</b>	<b>3</b>
17	10-/12-/14-MeC <sub>30</sub>	2	0
18	unknown	4	1
19	unknown	2	2
20	unknown	1	2
21	8,12-/8,14-diMeC <sub>30</sub>	4	1
22	unknown	<b>5</b>	0
23	C <sub>31:1</sub>	2	2
24	4,12-/4,14-diMeC <sub>30</sub>	0	1
25	unknown	2	2
26	n-C <sub>31</sub>	1	1

27	x,y,z-triMeC <sub>30</sub>	3	2
28	9-/11-/13-/15-MeC <sub>31</sub>	2	0
29	5-MeC <sub>31</sub>	2	0
30	unknown	<b>10</b>	1
31	9,11-/9,13-/9,15-diMeC <sub>31</sub>	5	1
32	3-MeC <sub>31</sub> + 5,13-/5,15- diMeC <sub>31</sub>	<b>6</b>	0
33	unknown	0	0
34	5,9,11-triMeC <sub>31</sub>	1	1
35	10-/12-/14-MeC <sub>32</sub>	2	0
36	unknown	0	1
37	10,14-/10,19-diMeC <sub>32</sub>	2	0
38	unknown	4	2
39	unknown	2	0
40	unknown	0	1
41	unknown	0	2
42	unknown	4	0
43	4,8,12-triMeC <sub>32</sub> + 9-/11- /13-/15-/17-MeC <sub>33</sub>	5	0
44	unknown	3	0
45	x,y-diMeC <sub>33</sub>	<b>5</b>	0
46	x,y-diMeC <sub>33</sub>	4	1
47	unknown	4	0
48	5,15-diMeC <sub>33</sub>	1	<b>3</b>
49	unknown	4	0
50	x,y-diMeC <sub>34</sub> ( ? )	4	2
51	unknown	0	1
52	unknown	1	0
53	unknown	2	0
54	unknown	1	1
55	unknown	0	0
56	unknown	0	2
57	unknown	1	0
58	unknown	0	1

---

## CHAPITRE 5

---

59	unknown	1
60	unknown	2
61	unknown	0
62	unknown	2
63	unknown	1





# DISCUSSION GÉNÉRALE



Durant cette thèse nous nous sommes intéressés aux mécanismes de communication impliqués dans l'apparition et le maintien de l'organisation sociale chez les fourmis. Dans une première partie nous avons étudié les processus de reconnaissance coloniale et de reconnaissance de la caste et du statut reproducteur chez la fourmi *Odontomachus hastatus*. Nous avons également décrit l'écologie chimique chez *O. hastatus* et identifié des hydrocarbures cuticulaires constituant de potentiels candidats pour signaler l'appartenance coloniale et le statut reproducteur des individus.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux interactions entre reproducteurs. Nous avons démontré que des reines fondatrices chez *Lasius niger* modulent leur agressivité envers d'autres reines en fonction de leur propre état de fertilité et de celui de leur rivale. Parallèlement, nous avons identifié des hydrocarbures candidats potentiellement impliqués dans ce phénomène d'estimation de la fertilité relative. Enfin nous avons réalisé des expériences pour confirmer que les reines fondatrices sont bien en mesure de percevoir les hydrocarbures cuticulaires produits par d'autres reines.

## I. ANALYSE DE LA CHIMIE CUTICULAIRE ET PERSPECTIVES

Durant ce travail de thèse, nous avons effectué des analyses préliminaires et novatrices sur l'écologie chimique chez *O. hastatus*. Nous avons montré que chez cette espèce, le profil en hydrocarbures cuticulaires est conservé entre différentes populations même pour des distances géographiques importantes (plus de 3000 kilomètres séparent les populations brésiliennes et guyanaises). D'autre part, nous avons vu également que le profil ne variait pas en fonction de l'organisation sociale au Brésil. Dans les chapitres 2 et 3, nous avons étudié les variations du profil en hydrocarbures entre colonies et entre castes et individus de statuts reproducteurs différents. Nos résultats indiquent qu'*O. hastatus* possède de grandes quantités de méthylalcènes, composés rares chez les fourmis et dont la fonction reste à déterminer (Blomquist & Bagnères 2010; Martin & Drijfhout 2009). Ces composés, présentant de longues chaînes carbonées (>33 carbones), peuvent être difficiles à déterminer et ces résultats nécessitent des analyses ultérieures pour confirmer la présence de tels composés (F. Menzel, communication personnelle). Nous avons également montré que les différentes castes (ouvrières et reines) possèdent des profils caractéristiques dont il sera nécessaire de définir finement les spécificités par la suite. Les reines matures semblent se différencier de

l'ensemble des autres individus par la production d'alcaadiènes dont certains sont spécifiques de ce groupe. De plus, dans le chapitre 2, nous avons montré que les alcanes linéaires pourraient représenter de bons candidats pour indiquer l'appartenance coloniale chez *O. hastatus* car la concentration relative de cette classe varie fortement entre les colonies.

Parallèlement, nous avons observé des variations importantes du profil en hydrocarbures chez des reines fondatrices de *Lasius niger* dont la fertilité augmente au cours de la fondation. Dans ce contexte également, la concentration de certains alcanes linéaires semble fortement corrélée à l'état de fertilité des reines.

Chez *O. hastatus* et *L. niger*, il est maintenant nécessaire de développer des bio-essais pour tester les fonctions que nous avons suggérées pour les alcaadiènes et les alcanes linéaires. L'objectif des bio-essais consiste à appliquer topiquement des composés candidats synthétiques sur certains individus et d'observer la réaction comportementale d'autres individus. Les alcanes linéaires étant disponibles dans le commerce, il sera donc possible de mener des expériences dans un futur proche pour déterminer s'ils jouent effectivement un rôle dans la reconnaissance coloniale chez *O. hastatus* et/ou s'ils sont perçus et interprétés comme des composés signalant la fertilité chez les reines fondatrices de *L. niger*. La possibilité de mener des bio-essais pour tester la fonction potentielle des alcaadiènes dans le signalement de la fertilité chez *O. hastatus* représentera un travail plus fastidieux. En effet les alcaadiènes sont des hydrocarbures insaturés (présence de deux doubles liaisons au sein de la chaîne carbonée) et il est donc nécessaire de réaliser des analyses complémentaires pour déterminer l'emplacement de ces doubles liaisons pour connaître l'identité précise des différents composés. Enfin, il est important de noter que le processus de synthèse de nouveaux hydrocarbures peut constituer un travail complexe, nécessitant des connaissances et des moyens financiers conséquents.

### **I.A. Etude des phéromones de reine chez *Odontomachus hastatus***

La grande quantité d'hydrocarbures appartenant à la classe des alcaadiènes chez les individus reproducteurs ainsi que l'absence de certains de ces composés chez les ouvrières et les fondatrices peut suggérer un rôle de cette classe structurale dans le signalement de l'état de fertilité chez *O. hastatus*. Le fait que l'on observe d'importantes différences quantitatives et qualitatives du profil en hydrocarbures entre les reines fondatrices et les reines matures indique que la différence de fertilité entre ces deux groupes est certainement importante. Nous n'avons pas comparé les capacités de ponte entre ces deux types de reines mais nous

avons vu qu'elles possédaient des développements ovariens très différents (Berthelot M2R 2013). Une question majeure à laquelle nous devons répondre, est de déterminer les différences en terme de physiologie reproductive et de signalement chimique entre des reines fondatrices de Guyane peu fertiles et des reines subordonnées au sein de colonies polygynes brésiliennes. En effet, ces deux catégories de reines devraient être caractérisées par une fertilité faible (hypothèse vérifiable en comparant les taux de ponte) et donc devraient exprimer des profils cuticulaires similaires. Enfin, pour être en mesure d'apprécier les changements induits par le développement ovarien, nous devons étudier la reproduction chez des ouvrières placées sans leur reine pour leur permettre de développer leurs ovaires. Nous pourrions alors identifier les hydrocarbures cuticulaires reflétant spécifiquement le développement des ovaires en comparant le profil de ces ouvrières avec celui de reines matures.

Afin de décrypter les mécanismes de communication chimique entre castes et au sein des castes, il est impératif de développer une analyse détaillée du comportement des individus. Lors de nos expériences, nous n'avons quantifié que les scores d'agressivité les plus élevés durant les interactions. Nous n'avons pas caractérisé précisément les différentes séquences comportementales lors des rencontres entre ouvrières, entre reines fondatrices et ouvrières ou entre reines matures et ouvrières. De même, nous n'avons pas collecté de données sur le comportement entre les ouvrières et les reines dans des colonies non manipulées (c'est-à-dire en dehors des périodes où ont été réalisées les expériences d'introduction). Quantifier le comportement des reines et des ouvrières et les interactions entre ces deux castes par des observations comportementales et des analyses des réseaux d'interactions sociales est une nécessité pour cibler les effets potentiels de phéromones de reine. En effet, rechercher un composé ou un ensemble de composés produits par les reines et entraînant un effet *releaser* chez les ouvrières nécessite en amont d'être en mesure de définir précisément le comportement des ouvrières lorsqu'elles sont en interaction ou à proximité de la reine. Par exemple, chez plusieurs espèces de fourmis, les ouvrières sont attirées par les composés chimiques émis par la reine et forment une sorte de « cortège » (*retinue*) autour d'elle. Ce comportement est très facilement observable dans les fondations de *Lasius niger*. Chez *Solenopsis invicta*, les ouvrières sont attirées et s'agrègent autour de la reine lorsque celle-ci est placée en dehors de son nid. Chez cette espèce, l'application sur un leurre de trois alcaloïdes produits par les reines dans leur glande à poison (Rocca et coll. 1983a, 1983b; Vander Meer et coll. 1980) permet de déclencher l'intégralité des comportements stéréotypés

des ouvrières spécifiquement exprimés en présence d'une reine fertile (Glancey et coll. 1984). Il est peu probable que les phéromones de reines chez *O. hastatus*, si elles existent bien, produisent des effets similaires (attraction et agrégation ou formation d'un « cortège ») car un tel effet est facilement identifiable et il n'est pas observé chez les Ponérines. Cependant, il est possible que les reines déclenchent un comportement de soumission chez les ouvrières, similaire à celui décrit chez d'autres espèces d'*Odontomachus* (Smith et coll. 2012; Smith et coll. 2016). Il est donc nécessaire d'effectuer une étude fine du comportement chez *O. hastatus* pour identifier les effets de la présence d'une reine sur le comportement des ouvrières. En combinant l'étude précise et quantitative de la chimie cuticulaire (extractions à l'hexane d'individus issus de différentes castes) et une analyse fine du comportement et de la physiologie reproductive des individus, nous serons en mesure d'isoler des composés cuticulaires potentiellement impliqués dans la communication du statut de fertilité chez *O. hastatus*.

### **I.B. Etude du signal de fertilité chez *Lasius niger***

Dans le chapitre 4, nous avons montré chez *L. niger* que les variations de l'état de fertilité des reines fondatrices se reflètent fortement dans leur profil chimique et sont associées à des augmentations ou à des diminutions de l'abondance relative des composés cuticulaires. En utilisant une approche statistique, nous avons montré que les composés qui permettent de ségréger les reines de différents états de maturité reproductive sont de bons prédicteurs de l'agressivité des reines focales. Ce résultat suggère que les reines pourraient donc se baser sur les variations de ces composés pour estimer l'état de leur rivale et ajuster leur comportement. Parmi les hydrocarbures cuticulaires principalement impliqués dans le changement du profil au cours de la maturation reproductive, on trouve, dans l'ordre décroissant en fonction de leur importance : l'hentriacontane (n-C<sub>31</sub>), le 5,9-diméthylheptacosane (5,9-diMeC<sub>28</sub>), un mélange de deux diméthyltritriacontanes (9,15- et 11,17-diMeC<sub>33</sub>), le 3-méthylheptacosane (3-MeC<sub>27</sub>), l'heptacosane (n-C<sub>27</sub>) et un heptacosène (C<sub>31:1</sub>). Ces composés appartiennent à l'ensemble des classes structurales des hydrocarbures identifiées chez *L. niger*, il nous est donc impossible de dire si une classe particulière est impliquée dans le signalement de la fertilité chez les reines de cette espèce. Parmi les composés décrits ci-dessus, certains ont déjà été repérés comme étant de bons candidats pour signaler la fertilité chez les reines de *L. niger* (n-C<sub>31</sub>, n-C<sub>27</sub>, 3-MeC<sub>27</sub>, diMeC<sub>33</sub>) (Holman et coll. 2010a). Nous ne retrouvons pas dans notre analyse le 3-méthylhentriacontane (3-MeC<sub>31</sub>), qui a été décrit chez *L. niger* comme une

phéromone de reine contrôlant la reproduction chez les ouvrières (Holman et coll. 2010b). Cependant, il n'est pas nécessairement prédit que les mêmes composés soient impliqués pour signaler la fertilité des reines et réguler l'activité reproductrice des ouvrières.

Un résultat inattendu de nos travaux sur *Lasius niger* est que la concentration relative d'aucun des composés cuticulaires identifiés n'est finement corrélée à l'activité de ponte individuelle des reines, reflet de la fertilité (données non montrées). Bien que les reines faiblement ou hautement fertiles diffèrent dans la proportion relative de certains composés cuticulaires, aucune corrélation entre le nombre d'œufs pondus par les reines peu fertiles ou par les reines très fertiles et les composés cuticulaires n'a pu être mise en évidence. En d'autres termes, aucun composé cuticulaire ne semble avoir une résolution suffisante pour permettre une évaluation précise de la fertilité des reines. Ainsi, le profil en hydrocarbures cuticulaires pourrait indiquer l'état global de maturité reproductive d'une reine mais pas sa productivité. Dans les conditions naturelles, les reines ne sont pas supposées présenter des variations dans leur fertilité aussi importantes que celles que nous avons créées expérimentalement. Il serait donc nécessaire qu'elles puissent baser leur estimation de la fertilité d'une rivale sur un composé signalant précisément son état de fertilité. Il est possible qu'il y ait un délai entre la modification du profil en hydrocarbures et la productivité instantanée de la reine (voir Cuvillier-Hot et coll. 2005) qui pourrait expliquer l'absence de relation entre le nombre d'œufs pondus et la concentration en HCC. Malgré l'importance de la découverte d'hydrocarbures jouant le rôle de phéromones de reines chez *Lasius niger*, les différentes études concernées n'ont pas explicitement abordé cette question. Dans leur étude réalisée en 2010(a), Holman et coll. montrent que la concentration en 3-methylhentriacontane (3-MeC31), l'hydrocarbure responsable du contrôle de la reproduction chez les ouvrières de *L. niger*, n'est pas corrélée à la productivité chez les reines. Ces considérations mettent en lumière une ambiguïté qui existe dans le lien entre hydrocarbures cuticulaires et fonctionnement du système reproductif. Chez certaines espèces, on constate une corrélation forte entre la quantité de certains hydrocarbures sur la cuticule d'un individu et son développement ovarien (Yagound et coll. 2014). Dans d'autres cas, les résultats sont plus mitigés : on constate un lien entre état de reproduction et concentration de certains HCC mais l'état de reproduction n'est pas clairement défini et représente un statut global plutôt qu'un état de fertilité précis (comme le taux de ponte par exemple). Cette ambiguïté résulte probablement de l'existence de différents moyens pour estimer la fertilité (Cini et coll. 2013). Pour lever cette ambiguïté, il sera nécessaire de déterminer quel aspect de la fertilité est

reflété par les concentrations des hydrocarbures qui corrèlent à la maturité reproductive des reines chez *L. niger*. Pour cela, il sera nécessaire de comparer les principales variables liées au fonctionnement de l'appareil reproducteur pour déterminer celles qui sont corrélées aux hydrocarbures cuticulaires. Parmi ces variables on peut citer l'état de développement ovarien (taille des ovaires, nombre d'ovocytes matures), les taux d'hormones liées à la reproduction comme l'hormone juvénile ou les ecdystéroïdes, les taux de neuromodulateurs (principalement les amines biogènes) et le taux de ponte mesuré sur une longue période (plusieurs semaines avec une précision de l'ordre du jour) en corrigeant pour le cannibalisme des œufs.

## II. INTERACTIONS ENTRE REINES CHEZ *LASIUS NIGER*

Nous avons vu dans la partie précédente que l'état de fertilité pourrait potentiellement être encodé par certains hydrocarbures cuticulaires de classes différentes chez *O. hastatus* et *L. niger*. L'objectif des chapitres 4 et 5 était d'étudier la capacité de reines à percevoir et évaluer l'état de fertilité d'autres reines. Nous avons également fait l'hypothèse que l'état de fertilité d'une reine pouvait modifier sa capacité à percevoir et/ou à réagir aux signaux produits par une autre reine. Pour cela il nous était impossible d'utiliser *Odontomachus hastatus* comme modèle d'étude car les expériences envisagées requéraient un nombre conséquent d'individus reproducteurs. Nous avons donc testé nos hypothèses chez les reines fondatrices de la fourmi *Lasius niger*.

Dans le chapitre 4, nous avons montré que la réaction comportementale d'une reine fondatrice de *L. niger* confrontée à une autre reine dépend à la fois de l'état de maturation reproductive de l'individu focal et de celui de son opposante. En effet, les reines en fin de fondation, qui possèdent un taux de ponte plus élevé, sont plus souvent agressives que les reines testées au début de la fondation, possédant un taux de ponte moins élevé (Figure 1, article 2). D'autre part, l'agressivité d'une reine focale est également dépendante de la maturité reproductive de la reine à laquelle elle est confrontée. Les reines non matures sont plus fréquemment la cible d'agressions que les reines matures. Il n'y a pas d'interaction entre l'état de la reine focale et celui de son opposante : les reines peu fertiles et fertiles réagissent de manière similaire à l'état de fertilité de leur opposante, à l'exception de la proportion d'individus agressifs plus élevée chez les reines focales fertiles.



Dans la discussion du chapitre 4, nous justifions ce résultat par l'écologie des fondations chez *Lasius niger*. En effet, une contrainte majeure à laquelle sont confrontées les fondations indépendantes est la productivité : le nombre d'ouvrières produites par les reines influence fortement la probabilité de survie de la colonie (Sommer & Hölldobler 1995). De ce fait, les reines subissent une forte pression pour produire des ouvrières en grande quantité sachant qu'en fondation claustrale, l'augmentation de la productivité entraîne nécessairement un affaiblissement de la reine qui utilise uniquement ses propres réserves pour élever son couvain. Durant le processus de fondation, les reines perdent entre 30 et 40% de leur poids initial (Aron et coll. 2009; Balas & Adams 1996; Sommer & Hölldobler 1995). Le fait de fonder une colonie collectivement avec d'autres fondatrices permet aux reines de partager le coût associé à la fondation claustrale tout en produisant une quantité plus importante d'ouvrières. On constate généralement une baisse de la productivité individuelle des reines lorsqu'elles fondent un nid en pléomérose. Cependant, une co-fondatrice peu productive constitue un handicap pour une fondatrice focale car elle devra assurer l'essentiel de la production d'ouvrières pour assurer la survie de la colonie et parallèlement conserver des ressources pour la phase de réduction de reine. Ainsi une reine non fertile pourrait représenter une forme de parasitisme social et les fondatrices pourraient avoir développé des capacités pour discriminer les reines fertiles des individus peu fertiles en vue d'éviter d'être exploitées durant le processus de fondation pléométrique.

La proportion importante de reines agressives sur l'ensemble des traitements dans l'expérience présentée dans le chapitre 4 constitue un aspect important à discuter. En effet, pour le traitement comprenant la proportion minimale de paires agressives nous avons observé une agression chez environ 40% des paires (soit environ 7 paires sur 18). Nous expliquons cette forte occurrence d'agressivité du fait que les reines testées ont déjà débuté le processus de ponte lors des rencontres et pourraient donc ne plus tolérer l'intrusion d'autres reines fondatrices à partir du début de la phase d'oviposition (i.e. un à deux jours après le vol nuptial). Nous avons effectué des expériences préliminaires sur l'influence de l'expérience sociale précoce chez les fondatrices en comparant l'agressivité en fin de fondation entre des reines issues de fondations haplo- ou pléométriques. Les résultats de cette expérience ne montrent pas d'influence de l'expérience sociale précoce sur l'agressivité exprimée en fin de fondation (voir aussi Dreier & D'Ettorre 2013). Il est donc possible que les reines fondatrices possèdent une fenêtre de tolérance quelque heures après le vol nuptial ou il leur est possible de s'associer à une autre reine. Lorsque les fondatrices commencent à pondre dans leur

retraite, il se pourrait qu'elles ne tolèrent plus l'intrusion d'autres reines qui pourrait représenter une menace pour leur couvain.

### III. L'ORGANISATION SOCIALE D'*O. HASTATUS*

#### III.A. Polymorphisme social et/ou polygynie facultative

Le polymorphisme social est caractérisé par la présence de colonies monogynes et polygynes au sein d'une même espèce. Théoriquement, le polymorphisme social diffère de la polygynie facultative par le fait que les colonies sont monogynes obligatoires dans le premier cas alors que la monogynie peut mener à de la polygynie secondaire dans le second cas. Chez certaines espèces, il semble exister une séparation forte, marquée par un flux de gènes réduit, entre les formes monogyne et polygyne (polymorphisme social) (Shoemaker & Ross 1996, Goropashnaya et coll. 2001, Gyllenstrand et coll. 2005, Schlick-Steiner et coll. 2007). A l'inverse, on observe un flux de gènes constant entre les deux formes indiquant une flexibilité dans l'organisation sociale à l'échelle populationnelle chez d'autres espèces (polygynie facultative) (Chapuisat et coll. 2004, DeHeer & Herbers 2004, Seppä et coll. 2004, Bargum et coll. 2007, Purcell & Chapuisat 2011). Il est difficile d'établir une différence claire entre polymorphisme social et polygynie facultative car certaines espèces semblent présenter les caractéristiques des deux phénomènes comme la fourmi *Formica selysi* (Purcell & Chapuisat 2011). Il est possible que les espèces montrant une plasticité dans leur organisation sociale constituent une étape intermédiaire pouvant évoluer vers une différenciation génétique entre formes sociales caractérisant un polymorphisme strict (flux de gènes réduit entre formes sociales). *O. hastatus* représente un modèle intéressant car on observe manifestement du polymorphisme social entre le Brésil et la Guyane française alors qu'au Brésil, la structure sociale serait flexible et pourrait s'apparenter à de la polygynie facultative.

#### III.B. Polygynie versus monogynie chez *O. hastatus*

Le type d'organisation sociale est généralement corrélé à un ensemble de traits caractéristiques regroupé sous le nom de syndrome (de polygynie ou de monogynie).

Un trait caractéristique de la polygynie est la taille réduite des reines associée à un poids plus faible (moins de ressources lipidiques) en comparaison de la taille et du poids importants observés chez les reines monogynes (Heinze & Keller 2000). La taille des reines semble

attribuable à un effet de la mère ou à un caractère génétique chez *Formica selysi* (Meunier & Chapuisat 2009) tandis que le poids des reines chez *Solenopsis invicta* dépend fortement de l'environnement social (colonie dans laquelle la reine effectue son développement imaginal) avec une faible interaction due au génotype (Keller & Ross 1993). Chez *O. hastatus*, les reines brésiliennes issues de colonies polygynes ne sont pas significativement plus petites que des reines issues de colonies monogynes, la tendance que l'on observe allant bien dans ce sens (voir Introduction partie III.A). Cependant une différence de taille mesurée par l'estimation de la taille de la tête n'est pas forcément représentative du poids des individus. Chez *S. invicta*, les reines issues des deux formes sociales ne diffèrent pas dans leur taille (estimée par la taille du thorax), cependant les reines issues de colonies monogynes sont bien plus lourdes et possèdent plus de réserves lipidiques que les reines issues de colonies polygynes (Keller & Ross 1993). Il sera donc nécessaire de comparer les réserves lipidiques des reines entre les deux formes sociales chez *O. hastatus* pour déterminer si l'organisation sociale influence ce trait. D'autre part, les reines de colonies polygynes sont souvent moins fertiles et moins longévives que les reines de colonies monogynes (Fletcher et coll. 1980; Vander Meer et coll. 1992). Nous n'avons pas constaté de différence de fertilité entre les reines brésiliennes ou guyanaises (observation personnelle, non quantifiée et réalisée sur un échantillon faible). Les colonies d'*O. hastatus* étant délicate à maintenir en élevage et la longévité des individus en laboratoire n'étant pas représentative de celle observable sur le terrain, nous ne disposons pas de données sur l'espérance de vie des reines.

Autre caractéristique des colonies polygynes : les reines ont tendance à disperser plus localement et à se reproduire dans leur colonie d'origine (Rissing & Pollock 1988). Néanmoins, une étude génétique chez la fourmi facultativement polygyne *Formica selysi* a montré que la polygynie ne semble pas affecter le schéma de dispersion des reines chez cette espèce (Chapuisat et coll. 2004). Les auteurs proposent comme explication que l'influence de l'organisation sociale sur la structuration génétique de la population pourrait relativement faible chez les espèces maintenant une plasticité sociale au sein d'une même population (comme les espèces facultativement polygynes). Il serait donc intéressant d'étudier les stratégies de dispersion des reines entre les colonies brésiliennes et guyanaises pour déterminer si la polygynie facultative au Brésil est caractérisée par une proportion mixte de reines dispersantes et non-dispersantes et la monogynie en Guyane par une dispersion obligatoire (Figure 12). Cependant, le faible nombre d'individus sexués produits dans les colonies rend difficile le suivi de la dispersion (il y a une forte probabilité pour qu'il n'y ait

pas d'essaimage massif chez *O. hastatus*). D'autre part, pour caractériser la structure sociale au Brésil, il est nécessaire de déterminer la relation de parenté entre reines au sein des colonies polygynes pour savoir si la polygynie dérive de l'adoption d'individus majoritairement apparentés. La ré-adoption de reines-filles par une colonie mature est un phénomène courant dans le cadre de la polygynie secondaire.

Dans un second temps, il est également important de réaliser des expériences d'introduction de fondatrices au sein des colonies brésiliennes en vue de comparer la réponse comportementale des ouvrières à celles des ouvrières de Guyane lors d'une simulation de polygynie secondaire. Il est possible de formuler différentes prédictions. Si les colonies brésiliennes monogynes et polygynes se comportent différemment lors de l'introduction de reines, alors on peut imaginer qu'*O. hastatus* est une espèce socialement polymorphe au Brésil. En revanche, si les colonies brésiliennes montrent une tolérance vis-à-vis de l'introduction de jeunes reines fondatrices indépendamment de leur forme sociale, cela suggérerait fortement que cette espèce est facultativement polygyne au Brésil.

En déterminant un ensemble de marqueurs microsatellites polymorphes chez *O. hastatus*, nous pourrions estimer la relation de parenté entre individus. Ainsi, lors des expériences d'introduction de jeunes reines au Brésil, nous aurions la possibilité de déterminer *a posteriori* la relation de parenté entre les individus introduits et les individus appartenant aux colonies résidentes. Cela nous permettrait alors de déterminer comment la parenté génétique influence le fait qu'une reine soit acceptée par les ouvrières d'une colonie mature.

### III.C. Déterminants de la monogynie en Guyane française

Quelle que soit la structure sociale chez *O. hastatus*, il semble nécessaire de comprendre pourquoi les colonies guyanaises n'atteignent jamais l'état polygyne. Nous pouvons proposer deux hypothèses, non mutuellement exclusives, qui expliqueraient la présence de polygynie au Brésil et son absence en Guyane française.

Dans un premier scénario, l'organisation sociale d'une population pourrait être déterminée par la stratégie de dispersion des fondatrices. En effet, si en Guyane les fondatrices ne tentent pas de s'introduire dans les nids matures tandis que leur homologues brésiliennes utilisent effectivement cette stratégie de fondation, cela pourrait expliquer les différences d'organisation sociale observées entre le Brésil et la Guyane. Nous avons effectué des expériences préliminaires montrant que les reines fondatrices en Guyane ne semblent ni attirées ni repoussées par un milieu marqué par une colonie résidente. Dans un second

scénario, les reines pourraient posséder la même propension à tenter d'entrer dans un nid mature dans les deux populations mais leur capacité à s'établir effectivement au sein de ces nids serait entièrement déterminée par le comportement et la tolérance vis-à-vis d'intrus des ouvrières résidentes de ces colonies. On pourrait alors supposer qu'au Brésil, les reines fondatrices soient tolérées par les ouvrières résidentes (peut-être différemment en fonction de leur apparentement avec ces ouvrières) mais qu'en Guyane, les ouvrières résidentes soient totalement intolérantes à la présence d'une reine fondatrice, que celle-ci leur soit apparentée ou non.

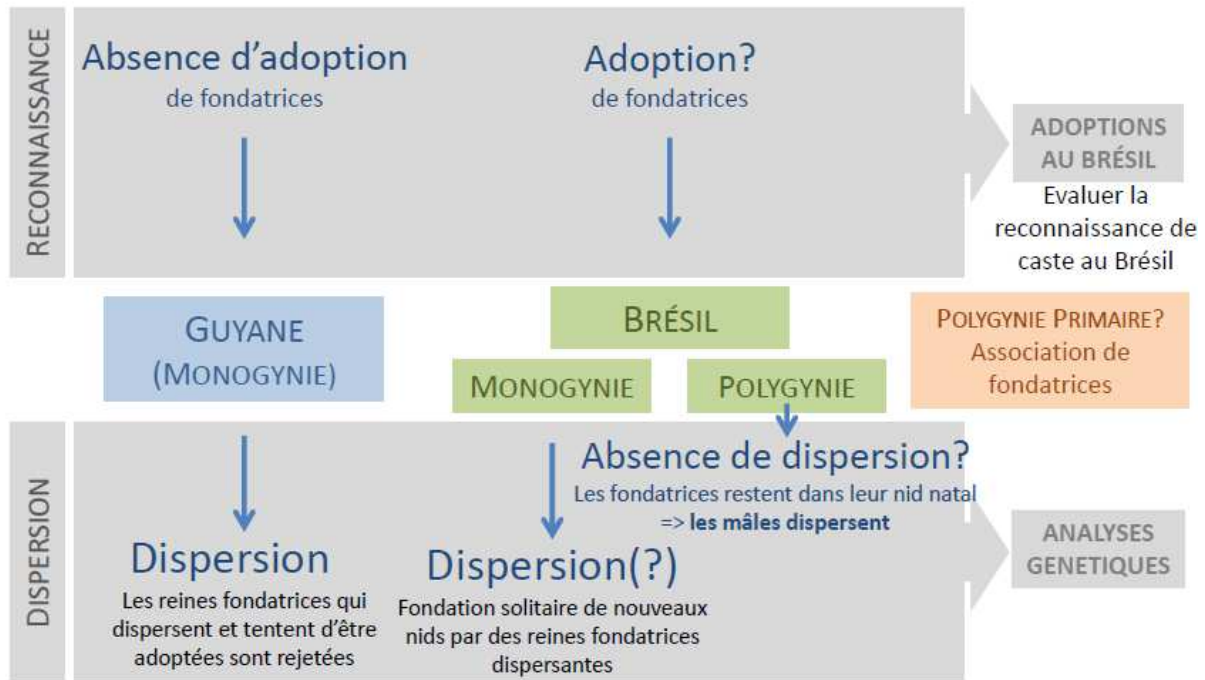
Ainsi, pour permettre de mieux comprendre les déterminants de l'organisation sociale chez *O. hastatus*, nous proposons d'effectuer des expériences comportementales d'introduction de reines fondatrices, en contrôlant le facteur d'apparentement génétique entre individus introduits et résidents, pour comparer la tolérance des ouvrières résidentes de nids matures entre le Brésil et la Guyane. De telles expériences permettraient de tester l'hypothèse que le comportement des ouvrières est effectivement responsable du maintien de la monogynie en Guyane française. Durant ces expériences il sera impératif de contrôler, dans la mesure du possible, l'âge des reines fondatrices (l'âge post-insémination). En effet, le développement de la fertilité chez ces reines déclenche nécessairement des changements dans le profil en HCC. Ainsi, deux reines fondatrices d'âge différent pourraient donc posséder des profils en hydrocarbures différents et de ce fait déclencher une réaction comportementale différente chez les ouvrières.

Un dernier scénario qui pourrait également mener à de la polygynie au Brésil est celui de la fondation pléométrotique qui aboutirait à de la polygynie primaire. Ce scénario a été décrit chez la Ponérine *Neoponera* (anciennement *Pachycondyla*) *inversa* où deux à quatre reines fondatrices peuvent s'associer (Trunzer et coll. 1998). Ce scénario nous semble fortement improbable du fait que la polygynie primaire est un phénomène rare. Les fondations sont délicates à localiser au Brésil, ainsi nous n'avons pas d'observations concernant le nombre de reines au sein des fondations brésiliennes. En Guyane les fondations collectées (au total N = 68) étaient strictement haplométrotiques.

La Figure 12 reprend ces différents scénarios et propose une synthèse expliquant les mécanismes du maintien de l'organisation sociale au Brésil et en Guyane Française. D'après nos diverses observations et expériences réalisées, le maintien de la monogynie en Guyane semble principalement dû à l'intolérance des ouvrières vis-à-vis de reines fondatrices et la

polygynie au Brésil semble être déterminée quasi-intégralement par la ré-adoption de jeunes reines fondatrices par leurs colonies natales.

Cependant, si cette prédiction est vérifiée, il serait ensuite nécessaire de comprendre les facteurs sous-tendant une telle différence comportementale entre ouvrières du Brésil et de Guyane. En effet, la différence de structure sociale implique nécessairement une modification des processus de communication entre individus. Dans les deux scénarios principaux proposés ci-dessus (si on met de côté la possibilité de polygynie primaire), la divergence d'organisation sociale est due soit à une différence dans la capacité des fondatrices à percevoir les indices fournis par des congénères (évitement des colonies matures en Guyane et pas au Brésil) soit à une modification de la tolérance des ouvrières vis-à-vis des reines fondatrices. Il est donc indispensable de comprendre comment s'opère cette modification des processus de perception et d'intégration de l'information sociale.



**Figure 12.** Différents scénarios proposés pour expliquer l'organisation sociale chez *Odontomachus hastatus* en fonction de la population (Brésil/Guyane Française). Les deux encadrés en gris définissent les deux scénarios principaux envisagés. Le premier scénario (en haut) est celui reposant sur la décision des ouvrières d'accepter ou non des reines fondatrices dispersantes en tant que nouveaux individus reproducteurs, c'est l'hypothèse formulée lors de la thèse. L'évaluation de cette hypothèse nécessite de réaliser des expériences d'adoption de reines au Brésil (suggéré par l'encadré en haut à droite). L'encadré du dessous propose une hypothèse alternative qui n'exclut pas le scénario précédent : l'organisation sociale pourrait dépendre des capacités/modes de dispersion des reines fondatrices qui pourraient différer entre les populations guyanaise et brésilienne. Enfin, l'encadré en orange propose une dernière hypothèse qui n'a pas été testée chez *O. hastatus* qui est la polygynie primaire (voir le texte).

#### IV. PROCESSUS DE COMMUNICATION

Les expériences de comportement que nous avons réalisées chez *O. hastatus* indiquent que les ouvrières réagissent différemment vis-à-vis d'ouvrières provenant de colonies et de sites différents (articles 1 et 2). De même nous avons montré qu'elles sont en mesure de discriminer les individus appartenant à différentes castes (article 2). Dans le chapitre 3, nous avons démontré que la réaction comportementale des ouvrières est principalement affectée

par la chimie de l'individu introduit (Figure 2, article 2). La chimie cuticulaire varie en fonction des sites et des zones mais les plus grandes variations du profil en hydrocarbures sont celles qui différencient les castes et les différents états de fertilité (chapitre 2 et 3). Cependant, l'organisation sociale ne semble pas engendrer de différence dans la chimie cuticulaire des colonies (chapitre 1). On observe des variations plus subtiles mais significatives entre différentes colonies au sein d'un même site (chapitre 2). De manière générale, nos données sur les profils en hydrocarbures cuticulaires correspondent à ce qui est décrit dans la littérature : les castes diffèrent entre elles par des différences quantitatives et surtout qualitatives, le signal colonial est très certainement encodé par des différences quantitatives et les individus fertiles (reines matures) sont caractérisés par la production de nombreux hydrocarbures insaturés (doublement insaturés dans notre cas).

#### **IV.A. Agressivité, fermeture coloniale et forme sociale**

L'agressivité entre colonies n'est pas très élevée chez *O. hastatus* en comparaison d'autres espèces chez lesquelles des ouvrières issues de colonies différentes s'engagent dans des combats létaux (Dahbi et coll. 1996). Cependant il est nécessaire de discuter des différentes méthodes utilisées dans les chapitres 1 et 3 pour étudier l'agressivité. En effet, dans le premier chapitre, l'agressivité entre colonies était mesurée lors de rencontres dyadiques entre deux ouvrières dans une boîte de Pétri. Le milieu d'interaction était donc un milieu neutre et il n'y avait pas d'asymétrie entre les deux ouvrières, c'est-à-dire que chacun des deux individus se trouvait dans le même contexte. En revanche, dans le chapitre 3 seule la réponse comportementale des ouvrières résidentes était observée et ces dernières rencontraient l'individu introduit sur leur nid où dans une boîte de Pétri dont le fond était recouvert d'un papier filtre imprégné de l'odeur de la colonie résidente. Dans ce cas, les ouvrières résidentes étaient placées dans un contexte de défense de leur nid face à une intrusion.

Le contexte des rencontres, social et/ou environnemental, influence fortement l'issue des interactions chez les fourmis (Buczkowski & Silverman 2005; Roulston et coll. 2003). Une arène vierge mime une rencontre en dehors du nid, en contexte neutre, par exemple entre deux fourrageuses. A l'opposé, l'introduction d'un individu sur un nid étranger où dans une boîte contenant les indices chimiques correspondant à un nid étranger simule le contexte de défense du nid chez les ouvrières résidentes. De plus, l'absence d'agressivité lors des rencontres en arène neutre n'implique pas une absence de reconnaissance des individus étrangers puisqu'on observe pour certains sites (INS et CAN) une différence significative



dans le type d'antennations effectuées par les ouvrières (lentes ou rapides) (voir chapitre 1, Figure 3 et Tableau 1) (voir Björkman-Chiswell et coll. 2008).

Les ouvrières d'*O. hastatus* fourragent individuellement dans un rayon de quelque mètres autour de leur nid (Camargo & Oliveira 2012), ainsi les rencontres entre deux fourrageuses doivent être des événements rares dans un environnement aussi complexe que la forêt guyanaise. On peut donc faire l'hypothèse que les ouvrières se tolèrent dans le cas où elles se croisent puisque la compétition devrait être relativement faible entre les nids. Dans ce cadre, l'absence d'agression est bénéfique pour les deux ouvrières sauf potentiellement si l'une d'elles se trouve à proximité de son nid.

#### **IV.B. Discrimination des castes et du statut de fertilité**

Une question majeure est d'identifier les signaux utilisés par les ouvrières pour identifier les reines fondatrices. Les analyses chimiques montrent que ces reines n'ont pas un profil intermédiaire entre les ouvrières et les reines matures. Les alcadiènes qui caractérisent le profil cuticulaire des reines ne sont pas présents (même en quantité moindre) chez les fondatrices. Cela peut indiquer qu'il y a une grande différence de maturité reproductive entre ces deux groupes. Une étude préliminaire du développement ovarien chez ces reines a en effet révélé d'importantes différences dans la tailles des ovaires entre les reines fondatrices et les reines matures (Berthelot M2R 2013).

Une question essentielle qui n'a pas encore été totalement résolue dans le domaine des signaux de fertilité chez les fourmis est de comprendre comment les individus parviennent à signaler à la fois une information coloniale, qui impliquent une conservation du signal entre membres de la colonie, et une information sur la fertilité caractérisée par une différence forte du signal entre membres de la même colonie possédant des états de fertilité différents (Hefetz 2007; Le Conte & Hefetz 2008; Moore & Liebig 2010). Une réponse à cette question est partiellement apportée par Martin et coll. (2008) qui proposent que des informations de nature différente (e.g. fertilité et appartenance coloniale) pourraient être encodées par différentes classes d'hydrocarbures. Les processus de biosynthèse de composés appartenant à des classes différentes étant relativement indépendants, il n'y aurait ainsi pas d'interférence dans la production de composés signalant différentes informations. Nos résultats des analyses de la chimie cuticulaire chez *O. hastatus* montrent que l'information concernant la maturité reproductive (et donc le statut de reine fertile) pourrait être encodée par la quantité d'alcadiènes qui représentent la classe majoritaire du profil en hydrocarbures des reines.

Cependant, les ouvrières présentent également des alcadiènes sur leur cuticule et la concentration relative de ces composés, comme celle des alcanes linéaires, semble variable entre les colonies (chapitre 2). Ainsi il est possible que les alcadiènes soient également impliqués dans la reconnaissance coloniale chez *O. hastatus* (même si cela reste très hypothétique). Etant donné que les alcadiènes produits par les reines sont spécifiques à ce groupe d'individus, il est probable que le signal de maturité reproductive soit encodé par des variations qualitatives de ces composés entre individus reproducteurs et non reproducteurs. A l'inverse, les ouvrières possèdent les mêmes hydrocarbures entre les différentes colonies et les variations dans les concentrations en alcadiènes que l'on observe sont principalement quantitatives. De ce fait, certains alcadiènes pourraient servir dans le signalement de l'appartenance coloniale au travers de différences quantitatives entre les colonies tandis que la production d'alcadiènes spécifiques aux reines indiquerait l'état de maturation reproductive. Le fait que les ouvrières réagissent de manière similaire face à leur propre mère ou à une reine mature étrangère tend à confirmer l'hypothèse que les alcadiènes représentent un signal de la maturité reproductrice indépendamment de l'appartenance coloniale ou de l'appartenance à une population spécifique (chapitre 3 ; voir aussi Smith et coll. 2013).

#### **IV.C. Interactions entre reines : retour vers de la monogynie ?**

L'organisation sociale d'une colonie dépend également des interactions entre les reines. Nous avons vu précédemment que chez *O. hastatus* des reines matures interagissent avec d'autres reines matures et établissent des relations de dominance mais n'interagissent pas avec des reines peu fertiles (i.e. des fondatrices) (Berthelot M2R 2013).

Ce résultat nous amène à la question suivante : comment des reines issues d'une population qui semble strictement monogyne et qui n'ont certainement jamais interagi avec une autre reine après avoir été fécondées (pas de fondation pléométrotique) sont-elles capables d'exprimer des comportements de dominance propres aux reines de colonie polygyne ? Ici nous ne pouvons que spéculer sur les causes d'un tel phénomène. Tout d'abord, il est possible que la population guyanaise ne soit pas complètement monogyne obligatoire et qu'il y ait encore de la plasticité dans l'organisation sociale des colonies. Cette hypothèse nous semble relativement improbable car dans ce cas, nous aurions dû au moins observer quelque cas de polygynie en Guyane. Une seconde hypothèse, plus plausible, est que la polygynie au Brésil dérive de comportements ancestraux de dominance entre individus reproducteurs. Ces comportements seraient exprimés par l'ensemble des individus, indépendamment de leur

organisation sociale et pourraient être également présents chez les ouvrières. Notre modèle d'étude appartient à la sous-famille des Ponérines, caractérisée par des reines peu spécialisées en comparaison des reines d'autres espèces et par des ouvrières qui ont généralement conservé un fort potentiel de reproduction. Dans ce contexte, il est courant d'observer des conflits entre castes et au sein des castes. Ainsi, les interactions de dominance entre reines monogynes pourraient être des comportements stéréotypés initialement impliqués dans la résolution des conflits de reproduction entre reines et ouvrières et qui auraient été cooptés pour réguler la reproduction entre reines dans les colonies polygynes. Oliveira et coll. (2011) ont observé des reines effectuer des comportements de dominance vis-à-vis d'ouvrières au sein d'une colonie monogyne et de deux colonies polygynes au Brésil. Les auteurs décrivent ces interactions comme similaires à celles observées entre reines dans les colonies polygynes. Ces observations, bien qu'anecdotiques, vont dans le sens de notre hypothèse.

Enfin, une dernière hypothèse serait que la polygynie puisse être l'état ancestral chez *O. hastatus* et que la monogynie soit un caractère dérivé. Cela expliquerait alors que les reines au sein de colonies monogynes aient conservé leur capacité à exprimer des relations de dominance lorsqu'elles sont confrontées à d'autres reines. La réversion d'un état polygyne vers un état monogyne est considérée comme peu probable chez les fourmis du fait des modifications associées à la polygynie chez les reines. Par exemple, l'impossibilité de fonder une colonie de manière solitaire ou la faible espérance de vie des reines chez les espèces polygynes rendent difficile un retour vers la monogynie qui est souvent associée à une fondation indépendante et à un faible renouvellement des reines au sein des colonies (et donc une espérance de vie importante de la reine). Un unique cas avéré de réversion vers de la monogynie a été documenté, au sein du genre *Cardiocondyla* (Schrempf & Heinze 2007). Ce groupe comprend des espèces monogynes qui sont apparues de manière secondaire. Chez ces espèces, les reines ont conservé des caractéristiques de reines d'espèces polygynes comme l'accouplement au sein du nid natal, la fondation non claustrale due à des réserves lipidiques faibles et une espérance de vie relativement courte (en comparaison de reines monogynes du genre *Temnothorax* présentant une taille équivalente et des colonies aux effectifs similaires). Les auteurs précisent que d'autres cas de réversion vers de la monogynie ont très probablement eu lieu chez les Formicidés. En particulier ils mentionnent les fourmis esclavagistes qui présentent de la monogynie alors qu'elles sont issues de clades où les espèces sont majoritairement polygynes. D'autre part, si la réversion vers la monogynie est principalement empêchée par l'incapacité des reines polygynes à ré-évoluer les caractères

associés à la monogynie (fondation indépendante, durée de vie élevée), les espèces socialement plastiques chez lesquelles les reines de forme sociale alternatives ne présentent pas de différences marquées pourraient plus facilement basculer de la polygynie vers de la monogynie. Chez *O. hastatus*, les différences morphologiques entre reines semblent aller à l'inverse du syndrome de polygynie : les reines issues de colonies monogynes sont plus petites que leur homologues polygynes. Ainsi, il est possible que les reines au Brésil aient la capacité de fonder de manière solitaire et qu'elles utilisent alternativement cette stratégie ainsi que celle consistant à se faire adopter en fonction du contexte auquel elles sont confrontées (capacité individuelle de la reine, conditions environnementales).

Une deuxième question que pose les résultats de rencontres entre reines guyanaises est de déterminer pourquoi les reines matures n'expriment pas de comportements de dominance lorsqu'elles sont confrontées à des reines fondatrices. Si les comportements de dominance entre reines sont effectivement dérivés d'interactions stéréotypées qui permettent à la reine d'asseoir son statut de reproductrice vis-à-vis des ouvrières, alors on s'attend à ce que les reines matures monogynes de Guyane exercent leur dominance sur les fondatrices qui sont en plein développement de leur ovaires. Premièrement, il est possible que nous n'ayons pas observé assez de rencontres entre reines matures et fondatrices pour détecter un comportement de *policing* (i.e. un comportement agonistique ayant pour but de réprimer la reproduction chez un autre individu). Une alternative plus intéressante serait que les reines matures pourraient utiliser des interactions agonistiques uniquement envers une compétitrice menaçante, c'est-à-dire possédant une fertilité équivalente, alors qu'elles ne réagiraient pas face à une compétitrice peu menaçante car ayant une faible fertilité. Cette hypothèse est en accord avec nos résultats. Tout d'abord, une reine fertile étrangère est acceptée par des ouvrières et donc elle peut effectivement entrer en compétition avec la reine résidente pour obtenir des soins de la part des ouvrières. D'autre part, à l'inverse, une reine fondatrice est violemment attaquée par les ouvrières, donc la reine mature n'a pas « besoin » (ou plutôt n'a pas l'occasion) de réguler la reproduction de cette dernière (voir également Cuvillier-Hot et coll. 2005). Enfin, une dernière possibilité serait que les reines fertiles produisent des phéromones qui inhibent le développement ovarien et que cette action soit suffisante pour contrôler le comportement reproducteur d'une fondatrice faiblement fertile. Les reines matures n'utiliseraient dans ce cas des relations de dominance qu'avec d'autres reines matures pour éviter d'être elles-mêmes inhibées par les phéromones produites par ces autres

reines. Lommelen et coll. (2010) montrent un phénomène similaire chez *Gnamptogenys striatula* : les *gamergates* (ouvrières reproductrices) n'utilisent des interactions agonistiques que lorsqu'ils sont confrontés à un individu de fertilité équivalente et utilisent un signalement chimique pour asseoir leur statut reproducteur vis-à-vis des individus moins fertiles ou stériles.

# CONCLUSIONS

Ce travail de thèse montre qu'*Odontomachus hastatus* présente une structure sociale idéale pour étudier les déterminants proximaux de la plasticité sociale chez les fourmis. Un élément important qui apportera de nombreuses réponses à certaines des interrogations soulevées dans cette discussion sera l'étude de la structure génétique des colonies brésiliennes et guyanaises d'*O. hastatus*. Nous avons déjà initié ces travaux grâce à l'exploitation d'une banque de marqueurs microsatellites. L'étude de l'écologie chimique initiée durant cette thèse ouvre des pistes intéressantes dans l'étude du rôle des hydrocarbures cuticulaires dans les processus de communication notamment avec la découverte de composés rares (les méthylalcènes) dont le rôle biologique reste à déterminer.

En conclusion, ce travail exploratoire chez une espèce peu connue ouvre plusieurs pistes de recherche intéressantes qui devraient significativement accroître notre compréhension des processus régulant les transitions entre différents niveaux d'organisation sociale.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Abbot, P., Abe, J., Alcock, J., Alizon, S., Alpedrinha, J. C., Andersson, M., ... & Zink, A. (2011). Inclusive fitness theory and eusociality. *Nature*, *471*(7339), E1–E4.
- Adams, E. S., & Balas, M. T. (1999). Worker discrimination among queens in newly founded colonies of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *45*(5), 330–338.
- Adams, E. S., & Tschinkel, W. R. (1995). Density-dependent competition in fire ants : effects on colony survivorship and size variation, *64*(3), 315–324.
- Akino, T., Yamamura, K., Wakamura, S., & Yamaoka, R. (2004). Direct behavioral evidence for hydrocarbons as nestmate recognition cues in *Formica japonica* (Hymenoptera: Formicidae). *Applied Entomology and Zoology*, *39*(3), 381–387.
- Aron, S., Steinhauer, N., & Fournier, D. (2009). Influence of queen phenotype, investment and maternity apportionment on the outcome of fights in cooperative foundations of the ant *Lasius niger*. *Animal Behaviour*, *77*(5), 1067–1074.

## B

- Balas, M. T., & Adams, E. S. (1996). The dissolution of cooperative groups: mechanisms of queen mortality in incipient fire ant colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *38*(6), 391–399.
- Bartz, S. H., & Hölldobler, B. (1982). Colony founding in *Myrmecocystus mimicus* Wheeler (Hymenoptera: Formicidae) and the evolution of foundress associations\*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *10*(2), 137–147.
- Bernasconi, G., & Keller, L. (1998). Phenotype and individual investment in cooperative foundress associations of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behavioral Ecology*, *9*(5), 478–485.
- Bernasconi, G., & Strassmann, J. E. (1999). Cooperation among unrelated individuals: the ant foundress case. *Trends in Ecology & Evolution*, *14*(12), 477–482.
- Billen, J., & Morgan, E. D. (1998). Pheromone communication in social insects: sources and secretions. In *Pheromone Communication in Social Insects Ants Wasps Bees and Termites*. (R. K. Vander Meer, M. D. Breed, K. E. Espelie & M. L. Winston, Eds.). Boulder (CO): Westview Press. (pp. 1–33).
- Björkman-Chiswell, B. T., Wilgenburg, E. van, Thomas, M. L., Swearer, S. E., & Elgar, M. A. (2008). Absence of aggression but not nestmate recognition in an Australian population of the Argentine ant *Linepithema humile*. *Insectes Sociaux*, *55*(2), 207–212.
- Blatrix, R., & Jaisson, P. (2000). Optional gamergates in the queenright ponerine ant *Gnamptogenys striatula* Mayr. *Insectes Sociaux*, *47*(2), 193–197.



- Blomquist, G. J., & Bagnères, A.-G. (2010). *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. (G. J. Blomquist & A.-G. Bagnères, Eds.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Boomsma, J. J., Huszar, D. B., & Pedersen, J. S. (2014). The evolution of multiqueen breeding in eusocial lineages with permanent physically differentiated castes. *Animal Behaviour*, *92*(June), 241–252.
- Boulay, R., Hefetz, A., Soroker, V., & Lenoir, A. (2000). *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbon exchanges. *Animal Behaviour*, *59*(6), 1127–1133.
- Bourke, A. F. G., & Franks, N. R. (1995). *Social Evolution in Ants*. (J. R. Krebs & T. Clutton-Brock, Eds.). Chichester, West Sussex: Princeton University Press.
- Bourke, A. F. G., & Heinze, J. (1994). The ecology of communal breeding: the case of multiple-queen Leptothoracine ants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *345*(1314), 359–372.
- Brandstaetter, A. S., Endler, A., & Kleineidam, C. J. (2008). Nestmate recognition in ants is possible without tactile interaction. *Naturwissenschaften*, *95*(7), 601–608.
- Brandstaetter, A. S., Rössler, W., Kleineidam, C. J., Rössler, W., & Kleineidam, C. J. (2011). Friends and foes from an ant brain's point of view - neuronal correlates of colony odors in a social insect. *PLoS ONE*, *6*(6), e21383.
- Brent, C., Peeters, C., Dietemann, V., Crewe, R., & Vargo, E. L. (2006). Hormonal correlates of reproductive status in the queenless ponerine ant, *Streblognathus peetersi*. *Journal of Comparative Physiology A*, *192*(3), 315–320.
- Brent, C. S., & Vargo, E. L. (2003). Changes in juvenile hormone biosynthetic rate and whole body content in maturing virgin queens of *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Physiology*, *49*(10), 967–974.
- Brunner, E., Kroiss, J., Trindl, A., & Heinze, J. (2011). Queen pheromones in Temnothorax ants: control or honest signal? *BMC Evolutionary Biology*, *11*(1), 55.
- Buczkowski, G., & Silverman, J. (2005). Context-dependent nestmate discrimination and the effect of action thresholds on exogenous cue recognition in the Argentine ant. *Animal Behaviour*, *69*(3), 741–749.

## C

---

- Cahan, S., Helms, K. R., & Rissing, S. W. (1998). An abrupt transition in colony founding behaviour in the ant *Messor pergandei*. *Animal Behaviour*, *55*(6), 1583–1594.

- Camargo, R. X., & Oliveira, P. S. (2012). Natural history of the Neotropical arboreal ant , *Odontomachus hastatus* : Nest sites, foraging schedule, and diet. *Journal of Insect Science*, 12(48), 1–9.
- Chapuisat, M., Bocherens, S., & Rosset, H. (2004). variable queen number in ant colonies: no impact on queen turnover, inbreeding, and population genetic differentiation in the ant *Formica Selysi*. *Evolution*, 58(5), 1064–1072.
- Cini, A., Meconcelli, S., & Cervo, R. (2013). Ovarian indexes as indicators of reproductive investment and egg-laying activity in social insects: A comparison among methods. *Insectes Sociaux*, 60(3), 393–402.
- Cronin, A. L., Molet, M., Doums, C., Monnin, T., & Peeters, C. (2013). recurrent evolution of dependent colony foundation across eusocial insects. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 37–55.
- Cronin, A. L., & Monnin, T. (2010). Self-sacrifice in “desperado” contests between relatives. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 27.
- Cuvillier-hot, V., Gadagkar, R., Peeters, C., & Cobb, M. (2002). Regulation of reproduction in a queenless ant : aggression , pheromones and reduction in conflict. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1497), 1295–1300.
- Cuvillier-Hot, V., Lenoir, A., Crewe, R., Malosse, C., & Peeters, C. (2004). Fertility signalling and reproductive skew in queenless ants. *Animal Behaviour*, 68(5), 1209–1219.
- Cuvillier-Hot, V., Lenoir, A., & Peeters, C. (2004). Reproductive monopoly enforced by sterile police workers in a queenless ant. *Behavioral Ecology*, 15(6), 970–975.
- Cuvillier-Hot, V., Renault, V., & Peeters, C. (2005). Rapid modification in the olfactory signal of ants following a change in reproductive status. *Naturwissenschaften*, 92(2), 73–77.
- Cvačka, J., Jiroš, P., Šobotník, J., Hanus, R., & Svatoš, A. (2006). Analysis of insect hydrocarbons using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy. *Journal of Chemical Ecology*, 32(2), 409–434.

## D

---

- d’Ettorre, P., & Heinze, J. (2005). Individual recognition in ant queens. *Current Biology*, 15(23), 2170–2174.
- d’Ettorre, P., Heinze, J., & Ratnieks, F. L. W. (2004). Worker policing by egg eating in the ponerine ant *Pachycondyla inversa*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1546), 1427–1434.
- Dahbi, A., Cerdá, X., Hefetz, A., & Lenoir, A. (1996). Social closure, aggressive behavior, and cuticular hydrocarbon profiles in the polydomous ant *Cataglyphis iberica* (hymenoptera, Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22(12), 2173–2186.

- Dahbi, A., Cerdá, X., Hefetz, A., & Lenoir, A. (1997). Adult transport in the ant *Cataglyphis iberica*: a means to maintain a uniform colonial odour in a species with multiple nests. *Physiological Entomology*, 22(1), 13–19.
- De Biseau, J. C., Passera, L., Daloze, D., & Aron, S. (2004). Ovarian activity correlates with extreme changes in cuticular hydrocarbon profile in the highly polygynous ant, *Linepithema humile*. *Journal of Insect Physiology*, 50(7), 585–593.
- Dreier, S., van Zweden, J. S., & d’Ettorre, P. (2007). Long-term memory of individual identity in ant queens. *Biology Letters*, 3(5), 459–462.
- Dreier, & D’Ettorre. (2013). Social context predicts recognition systems in ant queens. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(3), 644–649.

## E

- Ebie, J. D., Hölldobler, B., & Liebig, J. (2015). Larval regulation of worker reproduction in the polydomous ant *Novomessor cockerelli*. *Science of Nature*, 102(72), 2–5.
- Ehmer, B., & Gronenberg, W. (2004). mushroom body volumes and visual interneurons in ants: comparison between sexes and castes. *Journal of Comparative Neurology*, 469(2), 198–213.
- Eliyahu, D., Ross, K. G., Haight, K. L., Keller, L., & Liebig, J. (2011). Venom alkaloid and cuticular hydrocarbon profiles are associated with social organization, queen fertility status, and queen genotype in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Journal of Chemical Ecology*, 37(11), 1242–1254.
- Elmes, G. W. (1973). Observations on the density of queens in natural colonies of *Myrmica rubra* L. (Hymenoptera : Formicidae ). *Journal of Animal Ecology*, 42(3), 761–771.
- Elmes, G. W., & Petal, J. (1990). Queen number as an adaptable trait : evidence from wild populations of two red ant species (genus *Myrmica*). *Journal of Animal Ecology*, 59(2), 675–690.
- Endler, A., Liebig, J., Schmitt, T., Parker, J. E., Jones, G. R., Schreier, P., & Hölldobler, B. (2004). Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2945–2950.
- Esponda, F., & Gordon, D. M. (2015). Distributed nestmate recognition in ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1806), 20142838.
- Evans, J. D. (1996). Competition and relatedness between queens of the facultatively polygynous ant *Myrmica tahoensis*. *Animal Behaviour*, 51(4), 831–840.

**F**

- Fletcher, D. J. C., & Blum, M. S. (1981). Pheromonal control of dealation and oogenesis in virgin queen fire ants. *Science*, 212(4490), 73–75.
- Fletcher, D. J. C., Blum, M. S., Whitt, T. V., & Temple, N. (1980). Monogyny and polygyny in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Annals of the Entomological Society of America*, 73(6), 658–661.

**G**

- Galizia, C. G., & Rössler, W. (2010). Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 399–420.
- Glancey, B. M., Rocca, J. R., Lofgren, C. S., & Tumlinson, J. (1984). Field tests with synthetic components of the queen recognition pheromone of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Sociobiology*, 9(1), 19–30.
- Gotzek, D., & Ross, K. G. (2007). Genetic regulation of colony social organization in fire ants: an integrative overview, 82(3), 201–226.
- Gronenberg, W. (1999). Modality-specific segregation of input to ant mushroom bodies. *Brain, Behavior and Evolution*, 54(2), 85–95.
- Gronenberg, W. (2008). Structure and function of ant (Hymenoptera: Formicidae) brains: Strength in numbers. *Myrmecological News*, 11(August), 25–36.
- Guerrieri, F. J., Nehring, V., Jørgensen, C. G., Nielsen, J., Galizia, C. G., & D’Ettorre, P. (2009). Ants recognize foes and not friends. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1666), 2461–2468.

**H**

- Hadley, N. F. (1981). Cuticular lipids of terrestrial plants and arthropods: a comparison of their structure, composition, and waterproofing function. *Biological Reviews*, 56(1), 23–47.
- Hallem, E. A., Dahanukar, A., & Carlson, J. R. (2006). Insect odor and taste receptors. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 113–135.
- Hammond, R. L., Bruford, M. W., & Bourke, A. F. G. (2006). A test of reproductive skew models in a field population of a multiple-queen ant. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(2), 265–275.
- Hannonen, M., Sledge, M. F., Turillazzi, S., & Sundström, L. (2002). Queen reproduction, chemical signalling and worker behaviour in polygyne colonies of the ant *Formica fusca*. *Animal Behaviour*, 64(3), 477–485.

- Hannonen, M., & Sundström, L. (2003). Sociobiology: Worker nepotism among polygynous ants. *Nature*, *421*(6926), 910.
- Hartfelder, K. (2000). Insect juvenile hormone : from “status quo” to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *33*(2), 157–177.
- Hefetz, A. (2007). The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae) – interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy . A review. *Myrmecological News*, *10*(September), 59–68.
- Heinze, J. (1993). Queen-queen interactions in polygynous ants. In *Queen Number and Sociality in Insects*. (L. Keller, Ed.). Oxford: Oxford University Press. (pp. 334–361).
- Heinze, J., & D’Ettorre, P. (2009). Honest and dishonest communication in social Hymenoptera. *Journal of Experimental Biology*, *212*(12), 1775–1779.
- Heinze, J., Hölldobler, B., & Alpert, G. (1999). Reproductive conflict and division of labor in *Eutetramorium mocquerysi*, a Myrmicine ant without morphologically distinct female reproductives. *Ethology*, *105*(8), 701–717.
- Heinze, J., & Keller, L. (2000). Alternative reproductive strategies: A queen perspective in ants. *Trends in Ecology and Evolution*, *15*(12), 508–512.
- Heinze, J., & Smith, T. A. (1990). Dominance and fertility in a functionally monogynous ant. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *27*(1), 1–10.
- Heinze, J., Trunzer, B., Hölldobler, B., & Delabie, J. H. C. (2001). Reproductive skew and queen relatedness in an ant with primary polygyny. *Insectes Sociaux*, *48*(2), 149–153.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature Reviews. Neuroscience*, *4*(4), 266–275.
- Helanterä, H., Strassmann, J. E., Carrillo, J., & Queller, D. C. (2009). Unicolonial ants: where do they come from, what are they and where are they going? *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(6), 341–349.
- Helanterä, H., & Sundström, L. (2007a). Worker policing and nest mate recognition in the ant *Formica fusca*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *61*(8), 1143–1149.
- Helanterä, H., & Sundström, L. (2007b). Worker reproduction in *Formica* ants. *The American Naturalist*, *170*(1), 13–25.
- Helms Cahan, S. (2001). Cooperation and conflict in ant foundress associations: insights from geographical variation. *Animal Behaviour*, *61*(4), 819–825.
- Herbers, J. M. (1986). Nest site limitation and facultative polygyny in the ant *Leptothorax longispinosus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *19*(2), 15–22.
- Herbers, J. M. (1993). Ecological determinants of queen number in ants. In *Queen Number and Sociality in Insects*. (L. Keller, Ed.). Oxford: Oxford University Press. (pp. 262–294).

- Herbers, J. M., & Tucker, C. W. (1986). Population fluidity in *Leptothorax longispinosus* (Hymenoptera:Formicidae). *Psyche*, 93(3-4), 217–230.
- Hölldobler, B., & Carlin, N. F. (1985). Colony founding , queen dominance and oligogyny in the Australian meat ant *Iridomyrmex purpureus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 18(1), 45–58.
- Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1977). The number of queens: An important trait in ant evolution. *Naturwissenschaften*, 64(1), 8–15.
- Holman, L., Dreier, S., & d’Ettorre, P. (2010). Selfish strategies and honest signalling: reproductive conflicts in ant queen associations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1690), 2007–2015.
- Holman, L., Jørgensen, C. G., Nielsen, J., & d’Ettorre, P. (2010). Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1701), 3793–3800.
- Holman, L., Lanfear, R., & d’Ettorre, P. (2013). The evolution of queen pheromones in the ant genus *Lasius*. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(7), 1549–1558.
- Holman, L., Leroy, C., Jørgensen, C., Nielsen, J., & d’Ettorre, P. (2012). Are queen ants inhibited by their own pheromone? Regulation of productivity via negative feedback. *Behavioral Ecology*, 24(2), 380–385.
- Hora, R. R., Ionescu-hirsh, A., Simon, T., Delabie, J., Robert, J., Fresneau, D., & Hefetz, A. (2008). Postmating changes in cuticular chemistry and visual appearance in *Ectatomma tuberculatum* queens ( Formicidae : Ectatomminae ). *Naturwissenschaften*, 95(1), 55–60.
- Hughes, W. O. H., Oldroyd, B. P., Beekman, M., & Ratnieks, F. L. W. (2008). ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. *Science*, 320(5880), 1213–1217.

## I

---

- Ito, F., Yusoff, N. R., & Idris, A. H. (1996). Colony composition and queen behavior in polygynous colonies of the Oriental ponerine ant *Odontomachus rixosus* ( Hymenoptera Formicidae ). *Insectes Sociaux*, 86(1), 77–86.
- Izzo, A., Wells, M., Huang, Z., & Tibbetts, E. (2010). Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(5), 857–864.

## J

---

- Jackson, D. E. (2007). Social Evolution : Pathways to ant unicoloniality. *Current Biology*, 17(24), 1063–1064.

Jerome, C. A., McInnes, D. A., & Adams, E. S. (1998). Group defense by colony-founding queens in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioral Ecology*, 9(3), 301–308.

## K

---

Kamhi, J. F., & Traniello, F. A. (2013). Biogenic amines and collective organization in a superorganism: neuromodulation of social behavior in ants. *Brain, Behavior and Evolution*, 82(4), 220–236.

Keller, L. (1995). Social life: the paradox of multiple-queen colonies. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(9), 355–360.

Keller, L., & Nonacs, P. (1993). The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal? *Animal Behaviour*, 45(4), 787–794.

Keller, L., & Ross, K. G. (1993). Phenotypic plasticity and “cultural transmission” of alternative social organizations in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 33(2), 121–129.

Keller, L., & Ross, K. G. (1999). Major gene effects on phenotype and fitness: the relative roles of Pgm-3 and Gp-9 in introduced populations of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(4), 672–680.

Keller, L., & Ross, K. G. (2002). Experimental conversion of colony social organization by manipulation of worker genotype composition in fire ants (*Solenopsis invicta*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51(3), 287–295.

Kolmer, K., Hölldobler, B., & Heinze, J. (2002). Colony and population structure in *Pachycondyla cf. inversa*, a ponerine ant with primary polygyny. *Ethology Ecology & Evolution*, 14(2), 157–164.

Korb, J., & Heinze, J. (2004). Multilevel selection and social evolution of insect societies. *Naturwissenschaften*, 91(6), 291–304.

Krieger, M. J. B., & Ross, K. G. (2002). Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science*, 295(5553), 328–333.

## L

---

Lahav, S., Soroker, V., Hefetz, A., & Vander Meer, R. K. (1999). Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften*, 86(5), 246–249.

Le Conte, Y., & Hefetz, A. (2008). Primer pheromones in social hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 53(1), 523–542.

Lenoir, A., Depickère, S., Devers, S., Christidés, J. P., & Detrain, C. (2009). Hydrocarbons in the ant *Lasius niger*: From the cuticle to the nest and home range marking. *Journal of Chemical Ecology*, 35(8), 913–921.

- Leonhardt, S. D., Brandstaetter, A. S., & Kleineidam, C. J. (2007). Reformation process of the neuronal template for nestmate-recognition cues in the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193(9), 993–1000.
- Liebig, J. (2010). Hydrocarbon profiles indicate fertility and dominance status in ant, bee, and wasp colonies. In *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. (G. J. Blomquist & A.-G. Bagnères, Eds.). Cambridge: Cambridge University Press. (pp. 254–282).
- Liebig, J., Peeters, C., & Hölldobler, B. (1999). Worker policing limits the number of reproductives in a ponerine ant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1431), 1865–1870.
- Liebig, J., Peeters, C., Oldham, N. J., Markstädter, C., & Hölldobler, B. (2000). Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4124–31.
- Lockey, K. H. (1980). Insect cuticular hydrocarbons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 65(3), 457–462.
- Lommelen, E., Wenseleers, T., Billen, J., & Gobin, B. (2010). A combination of fertility signals and aggression regulates reproduction in the ant *Gnamptogenys striatula*. *Journal of Insect Behavior*, 23(3), 236–249.

## M

- Martin, S. J., & Drijfhout, F. (2009a). A review of ant cuticular hydrocarbons. *Journal of Chemical Ecology*, 35(10), 1151–1161.
- Martin, S. J., & Drijfhout, F. P. (2009b). Nestmate and task cues are influenced and encoded differently within ant cuticular hydrocarbon profiles. *Journal of Chemical Ecology*, 35(3), 368–374.
- Martin, S. J., Vitikainen, E., Helanterä, H., & Drijfhout, F. P. (2008). Chemical basis of nestmate discrimination in the ant *Formica exsecta*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1640), 1271–1278.
- Maynard Smith, J., & Szathmary, E. (1997). *The Major Transitions in Evolution*. (J. Maynard Smith & E. Szathmary, Eds.). Oxford: Oxford University Press.
- Medeiros, F., Lopes, L., Moutinho, P., Oliveria, P., & Hölldobler, B. (1992). Functional polygyny, agonistic interactions and reproductive dominance in the neotropical ant *Odontomachus chelifer* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). *Ethology*, 146(2), 134–146.
- Menzel, F., Blüthgen, N., & Schmitt, T. (2008). Tropical parabiotic ants: Highly unusual cuticular substances and low interspecific discrimination. *Frontiers in Zoology*, 5(1), 16.



- Meunier, J., & Chapuisat, M. (2009). The determinants of queen size in a socially polymorphic ant. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(9), 1906–1913.
- Mintzer, A. C. (1987). Primary polygyny in the ant *Atta texana*: Number and weight of females and colony foundation success in the laboratory. *Insectes Sociaux*, 34(2), 108–117.
- Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Annales Zoologici Fennici*, 43(5–6), 515–530.
- Monnin, T., & Peeters, C. (1997). Cannibalism of subordinates' eggs in the monogynous queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *Naturwissenschaften*, 89(11), 499–502.
- Moore, D., & Liebig, J. (2010). Mixed messages: Fertility signaling interferes with nestmate recognition in the monogynous ant *Camponotus floridanus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(6), 1011–1018.

## N

---

- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., & Nishikawa, M. (2009). Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: Structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell and Tissue Research*, 338(1), 79–97.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., & Nishikawa, M. (2010). sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: glomerular organizations of antennal lobes. *Journal of Comparative Neurology*, 518(12), 2186–2201.
- Newey, P. S. (2011). Not one odour but two: A new model for nestmate recognition. *Journal of Theoretical Biology*, 270(1), 7–12.
- Newey, P. S., Robson, S. K. A., & Crozier, R. H. (2010). Know thine enemy: Why some weaver ants do but others do not. *Behavioral Ecology*, 21(2), 381–386.
- Nishikawa, M., Watanabe, H., & Yokohari, F. (2012). Higher brain centers for social tasks in worker ants, *Camponotus japonicus*. *Journal of Comparative Neurology*, 520(7), 1584–
- Nunes, T. M., Morgan, E. D., Drijfhout, F. P., & Zucchi, R. (2010). Caste-specific cuticular lipids in the stingless bee *Friesella schrottkyi*. *Apidologie*, 41(5), 579–588.

## O

---

- Okada, Y., Sasaki, K., Miyazaki, S., Shimoji, H., Tsuji, K., & Miura, T. (2015). Social dominance and reproductive differentiation mediated by dopaminergic signaling in a queenless ant. *Journal of Experimental Biology*, 218(7), 1091–1098.
- Oliveira, P. S., Camargo, R. X., & Fourcassié, V. (2011). Nesting patterns, ecological correlates of polygyny and social organization in the neotropical arboreal ant *Odontomachus hastatus* (Formicidae, Ponerinae). *Insectes Sociaux*, 58(2), 207–217.

- Ortius, D., & Heinze, J. (1999). Fertility signaling in queens of a North American ant. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *45*(2), 151–159.
- Ozaki, M., & Hefetz, A. (2014). Neural mechanisms and information processing in recognition systems. *Insects*, *5*(4), 722–741.
- Ozaki, M., Wada-Katsumata, A., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nisimura, T., & Yamaoka, R. (2005). Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*, *309*(5732), 311–314.

## P

---

- Pedersen, J. S., & Boomsma, J. J. (1999). Effect of habitat saturation on the number and turnover of queens in the polygynous ant, *Myrmica sulcinodis*. *Journal of Evolutionary Biology*, *12*(5), 903–917.
- Peeters, C. (1991). The occurrence of sexual reproduction among ant workers. *Biological Journal of the Linnean Society*, *44*(2), 141–152.
- Peeters, C. (1993). Monogyny and polygyny in ponerine ants with or without queens. In *Queen Number and Sociality in Insects*. (L. Keller, Ed.). Oxford: Oxford University Press. (pp. 234–262).
- Peeters, C., & Ito, F. (2001). Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, *46*(1), 601–630.
- Peeters, C., & Liebig, J. (2009). Fertility signaling as a general mechanism of regulating reproductive division of labour in ants. In *Organization of insect societies - From Genom to Sociocomplexity*. (J. Gadau & J. H. Fewell, Eds.). (pp. 220–243).
- Peeters, C., Liebig, J., & Hölldobler, B. (2000). Sexual reproduction by both queens and workers in the ponerine ant *Harpegnathos saltator*. *Insectes Sociaux*, *47*(4), 325–332.
- Peeters, C., Monnin, T., & Malosse, C. (1999). Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queenless ant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *266*(1426), 1323–1327.
- Penick, C. A., Brent, C. S., Dolezal, K., & Liebig, J. (2014). Neurohormonal changes associated with ritualized combat and the formation of a reproductive hierarchy in the ant *Harpegnathos saltator*. *Journal of Experimental Biology*, *217*(9), 1496–1503.
- Penick, C. A., Liebig, J., & Brent, C. S. (2011). Reproduction, dominance, and caste: endocrine profiles of queens and workers of the ant *Harpegnathos saltator*. *Journal of Comparative Physiology A*, *197*(11), 1063–1071.
- Pfennig, D. W. (1995). Absence of joint nesting advantage in desert seed harvester ants: evidence from a field experiment. *Animal Behaviour*, *49*(3), 567–575.
- Purcell, J., Brelsford, A., Wurm, Y., Perrin, N., & Chapuisat, M. (2014). Convergent genetic architecture underlies social organization in ants. *Current Biology*, *24*(22), 2728–2732.

Purcell, J., & Chapuisat, M. (2013). Bidirectional shifts in colony queen number in a socially polymorphic ant population. *Evolution*, 67(4), 1169–1180.

## R

Ramirez-Esquivel, F., Zeil, J., & Narendra, A. (2014). The antennal sensory array of the nocturnal bull ant *Myrmecia pyriformis*. *Arthropod Structure and Development*, 43(6), 543–558.

Reeve, H. K. (1989). The evolution of conspecific acceptance thresholds. *The American Naturalist*, 133(3), 407–435.

Reeve, H. K., & Keller, L. (2001). Tests of reproductive-skew models in social insects. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 347–385.

Renthal, R., Velasquez, D., Olmos, D., Hampton, J., & Wergin, W. P. (2003). Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*, 34(8), 405–413.

Richard, F. J., & Hunt, J. H. (2013). Intracolony chemical communication in social insects. *Insectes Sociaux*, 60(3), 275–291.

Rissing, S. W., & Pollock, G. B. (1987). Queen aggression, pleometrotic advantage and brood raiding in the ant *Veromessor pergandei* (Hymenoptera: Formicidae). *Animal Behaviour*, 35(4), 975–981.

Rissing, S. W., & Pollock, G. B. (1988). Pleometrosis and polygyny in ants. In *Interindividual Behavioural Variability in Social Insects*. (R. L. Jeanne, Ed.). Boulder (CO): Westview Press. (pp. 179–222).

Rissing, S. W., & Pollock, G. B. (1991). An experimental analysis of pleometrotic advantage in the desert seed-harvester ant *Messor pergandei* (Hymenoptera; Formicidae). *Insectes Sociaux*, 38(2), 205–211.

Robinson, G. E. (1987). Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20(5), 329–338.

Rocca, J. R., Tumlinson, B. M., Glancey, B. M., & Lofgren, C. S. (1983a). Synthesis and stereochemistry of tetrahydro-3,5-dimethyl-6-(1-methylbutyl)-2H-Pyran-2-one, a component of the queen recognition pheromone of *Solenopsis invicta*. *Tetrahedron Letters*, 24(18), 1893–1896.

Rocca, J. R., Tumlinson, B. M., Glancey, B. M., & Lofgren, C. S. (1983b). The queen recognition pheromone of *Solenopsis invicta*, preparation of (E)-6-(1-pentenyl)-2H-pyran-2-one. *Tetrahedron Letters*, 24(18), 1889–1892.

Ross, K. G., & Keller, L. (1998). Genetic control of social organization in an ant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14232–14237.

Rössler, W., & Zube, C. (2011). Dual olfactory pathway in Hymenoptera: Evolutionary insights from comparative studies. *Arthropod Structure and Development*, 40(4), 349–

357.

Roulston, T. H., Buczkowski, G., & Silverman, J. (2003). Nestmate discrimination in ants: Effect of bioassay on aggressive behavior. *Insectes Sociaux*, 50(2), 151–159.

---

## S

---

Sasaki, K., Jibiki, E., Satoh, T., & Obara, Y. (2005). Queen phenotype and behaviour during cooperative colony founding in *Polyrhachis moesta*. *Insectes Sociaux*, 52(1), 19–25.

Schrempf, A., & Heinze, J. (2007). Back to one : Consequences of derived monogyny in an ant with polygynous ancestors. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(2), 792–799.

Seid, M., & Wehner, R. (2008). Ultrastructure and synaptic differences of the boutons of the projection neurons between the lip and collar regions of the mushroom bodies in the ant, *Cataglyphis albicans*. *The Journal of Comparative Neurology*, 507(1), 1102–1108.

Seppä, P. (1994). Sociogenetic organization of the ants *Myrmica ruginodis* and *Myrmica lobicornis* : Number , relatedness and longevity of reproducing individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, 7(1), 71–95.

Sharma, K. R., Enzmann, B. L., Schmidt, Y., Moore, D., Jones, G. R., Parker, J., Berger, S.L., Reinberg, D., Zwiebel, L. J., Breit, B., Liebig, J., & Ray, A. (2015). cuticular hydrocarbon pheromones for social behavior and their coding in the ant antenna. *Cell Reports*, 12(8), 1261–71.

Sherman, P. W., Reeve, H. K., & Pfennig, D. W. (1997). Recognition systems. In *Behavioural ecology: an evolutionary approach* (4<sup>th</sup> Edition). (J. R. Krebs & N. B. Davies, Eds.). Wiley-Blackwell. (pp. 69–96).

Smith, A. A., Hölldobler, B., & Liebig, J. (2008). Hydrocarbon signals explain the pattern of worker and egg policing in the ant *Aphaenogaster cockerelli*. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1275–1282.

Smith, A. A., Hölldobler, B., & Liebig, J. (2009). Cuticular hydrocarbons reliably identify cheaters and allow enforcement of altruism in a social insect. *Current Biology*, 19(1), 78–81.

Smith, A. A., Hölldobler, B., & Liebig, J. (2011). Reclaiming the crown : queen to worker conflict over reproduction in *Aphaenogaster cockerelli*. *Naturwissenschaften*, 98, 237–240.

Smith, A. A., Millar, J. G., Hanks, L. M., & Suarez, A. V. (2012). Experimental evidence that workers recognize reproductives through cuticular hydrocarbons in the ant *Odontomachus brunneus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(9), 1267–1276.

Smith, A. A., Millar, J. G., Hanks, L. M., & Suarez, A. V. (2013). A conserved fertility signal despite population variation in the cuticular chemical profile of the trap-jaw ant *Odontomachus brunneus*. *Journal of Experimental Biology*, 216(20), 3917–3924.

- Smith, A. A., Millar, J. G., & Suarez, A. V. (2015). A social insect fertility signal is dependent on chemical context. *Biology Letters*, *11*(1), 20140947.
- Smith, A. A., Millar, J. G., & Suarez, A. V. (2016). Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* trap-jaw ants. *Journal of Experimental Biology*, *219*(3), 419–430.
- Sommer, K., & Hölldobler, B. (1995). Colony founding by queen association and determinants of reduction in queen number in the ant *Lasius niger*. *Animal Behaviour*, *50*(2), 287–294.
- Sommer, K., Hölldobler, B., & Rembold, H. (1993). Behavioral and physiological aspects of reproductive control in a Diacamma species from Malaysia (Formicidae, Ponerinae). *Ethology*, *94*(2), 162–170.
- Soroker, V., Hefetz, A., Cojocar, M., Billen, J., & Franke, S. (1995). Structural and chemical ontogeny of the postpharyngeal gland in the desert ant *Cataglyphis niger*. *Physiological Entomology*, *20*(4), 323–329.
- Sturgis, S. J., & Gordon, D. M. (2012a). Aggression is task dependent in the red harvester ant (*Pogonomyrmex barbatus*). *Behavioral Ecology*, *24*(2), 532–539.
- Sturgis, S. J., & Gordon, D. M. (2012b). Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): A review. *Myrmecological News*, *16*(January), 101–110.

## T

---

- Trettin, J., Seyferth, T., & Heinze, J. (2014). Behavioral plasticity in ant queens: environmental manipulation induces aggression among normally peaceful queens in the socially polymorphic ant *Leptothorax acervorum*. *PLoS ONE*, *9*(4), e95153.
- Tribble, W., & Ross, K. G. (2016). Chemical communication of queen supergene status in an ant. *Journal of Evolutionary Biology*, *29*(3), 502–513.
- Trunzer, B., Heinze, J., & Hölldobler, B. (1998). Cooperative colony founding and experimental primary polygyny in the ponerine ant *Pachycondyla villosa*. *Insectes Sociaux*, *45*(3), 267–276.
- Tschinkel, W. R., & Howard, D. F. (1983). Colony founding by pleometrosis in the fire ant, *Solenopsis invicta*\*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *12*(2), 103–113.

## V

---

- Van Oystaeyen, A., Oliveira, R. C., Holman, L., van Zweden, J. S., Romero, C., Oi, C. A., d'Etterre, P., Mohammadreza, K., Billen, J., Wackers, F., & Wenseleers, T. (2014). Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. *Science*, *343*(6168), 287–290.

- van Zweden, J. S., & D’Ettorre, P. (2010). Nestmate recognition in ants. In *Insects Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. (G. J. Blomquist & A.-G. Bagnères, Eds.). Cambridge: Cambridge University Press. (pp. 222–244).
- Vander Meer, R. K., Glancey, B. M., Lofgren, C. S., Glover, A., Tumlinson, J. H., & Rocca, J. (1980). The poison sac of red imported fire ant queens: Source of a pheromone attractant. *Annals of the Entomological Society of America*, 73(5), 609–612.
- Vander Meer, R. K., & Morel, L. (1995). Ant queens deposit pheromones and antimicrobial agents on eggs. *Naturwissenschaften*, 82(2), 93–95.
- Vander Meer, R. K., Morel, L., & Lofgren, C. S. (1992). A comparison of queen oviposition rates from monogyne and polygyne fire ant, *Solenopsis invicta*, colonies. *Physiological Entomology*, 17(4), 384–390.
- Vargo, E. L. (1988). Effect of pleometrosis and colony size on the production of sexuals in monogyne colonies of the fire ant *Solenopsis invicta*. In *Advances in Myrmecology*. (J. C. Tragger, Ed.). Gainesville: Florida University Press (pp. 217–226).
- Vargo, E. L., & Hulsey, C. D. (2000). Multiple glandular origins of queen pheromones in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Physiology*, 46(8), 1151–1159.
- Vienne, C., Soroker, V., & Hefetz, A. (1995). Congruency of hydrocarbon patterns in heterospecific groups of ants : Transfer and/or biosynthesis ? *Insectes Sociaux*, 42(3), 267–277.
- Villet, M. (1990). Qualitative relations of egg size , egg production and colony size in some ponerine ants ( Hymenoptera : Formicidae ). *Journal of Natural History*, 24(5), 37–41.
- Vosshall, L. B., Wong, a M., & Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102(2), 147–59.

## W

---

- Wagner, D., Tissot, M., & Gordon, D. (2001). Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *Journal of Chemical Ecology*, 27(9), 1805–1819.
- Wang, J. W., Wong, A. M., Flores, J., Vosshall, L. B., & Axel, R. (2003). Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell*, 112(2), 271–282.
- Wang, J., Wurm, Y., Nipitwattanaphon, M., Riba-Grognuz, O., Huang, Y.-C., Shoemaker, D., & Keller, L. (2013). A Y-like social chromosome causes alternative colony organization in fire ants. *Nature*, 493(7434), 664–668.
- Wang, Q., Goodger, J. Q. D., Woodrow, I. E., & Elgar, M. A. (2016). Location-specific cuticular hydrocarbon signals in a social insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1827), 20160310.

Wheeler, D. E., & Buck, N. A. (1995). Storage proteins in ants during development and colony founding. *Journal of Insect Physiology*, 41(10), 885–894.

Wilson, E. O. (1974). The population consequences of polygyny in the ant *Leptothorax curvispinosus*. *Annals of the Entomological Society of America*, 67(5), 781-786.

## Y

---

Yagound, B., Blacher, P., Fresneau, D., Poteaux, C., & Châline, N. (2014). Status discrimination through fertility signalling allows ants to regulate reproductive conflicts. *Animal Behaviour*, 93(July), 25–35.

Yamagata, N., Nishino, H., & Mizunami, M. (2006). Pheromone-sensitive glomeruli in the primary olfactory centre of ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1598), 2219–2225.

## Z

---

Zube, C., Kleinedam, C. J., Kirschner, S., Neef, J., & Rössler, W. (2008). Organization of the olfactory pathway and odor processing in the antennal lobe of the ant *Camponotus floridanus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 506(3), 425–441.





*À Élie Yaffa*



## **Abstract**

In ants, the number of reproductive within the colony is a highly plastic trait between and within species and even at the population level. The shift from one (monogyny) towards several (polygyny) reproductive monopolising the reproductive function of the colony represents a major transition in the evolution of sociality. The five chapters of the present thesis are devoted to the study of the communication processes involved in the transition between the two major social organisation systems (monogyny and polygyny) using as a main model the ant *Odontomachus hastatus*. These works, which combine behavioural and electrophysiological studies as well as chemical analyses, suggest that communication processes via chemical information strongly determine the social organisation of the colony.

**Keywords:** agonistic behaviours, cuticular hydrocarbons, perception, chemical cues, queens

**Auteur :** Kévin BERTHELOT

**Titre :** Communication chimique et reconnaissance de castes chez les fourmis *Odontomachus hastatus* et *Lasius niger*

**Directeur de thèse :** Raphaël JEANSON

**Lieu et date de soutenance:** Toulouse, le 8 Décembre 2016

**Résumé:**

Chez les Formicidés, le nombre de reproducteurs par colonie est un trait fortement plastique entre les espèces, au sein des espèces et même à l'échelle populationnelle. Le passage d'un (monogynie) à plusieurs (polygynie) reproducteurs par colonie constitue une transition majeure dans l'évolution de la socialité. Les cinq chapitres de la présente thèse sont consacrés à l'étude des processus de communication impliqués dans la transition entre les deux grands types d'organisation sociale (monogynie et polygynie) en utilisant comme modèle principal la fourmi *Odontomachus hastatus*. Ces travaux, combinant études comportementales et électro-physiologiques et analyses chimiques suggèrent que les processus de communication chimique déterminent fortement l'organisation sociale de la colonie.

**Mots clés :** comportements agonistiques, hydrocarbures cuticulaires, perception, indices chimiques, reines

**Discipline :** Ethologie

**Laboratoire:** Centre de Recherches sur la Cognition Animale-UMR 5169-CNRS -  
Université Paul Sabatier (Toulouse III)