



Étude des bases chimiques et comportementales de la formation du "visa" colonial chez les Ponérines du genre *Pachycondyla*

Christophe Lucas

► To cite this version:

Christophe Lucas. Étude des bases chimiques et comportementales de la formation du "visa" colonial chez les Ponérines du genre *Pachycondyla*. Biodiversité et Ecologie. Université paris sud, 2002. Français. <NNT : >. <tel-02266578>

HAL Id: tel-02266578

<https://hal.science/tel-02266578v1>

Submitted on 10 Jan 2020

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

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



HAL Authorization

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Biologie du Comportement

par

Christophe LUCAS

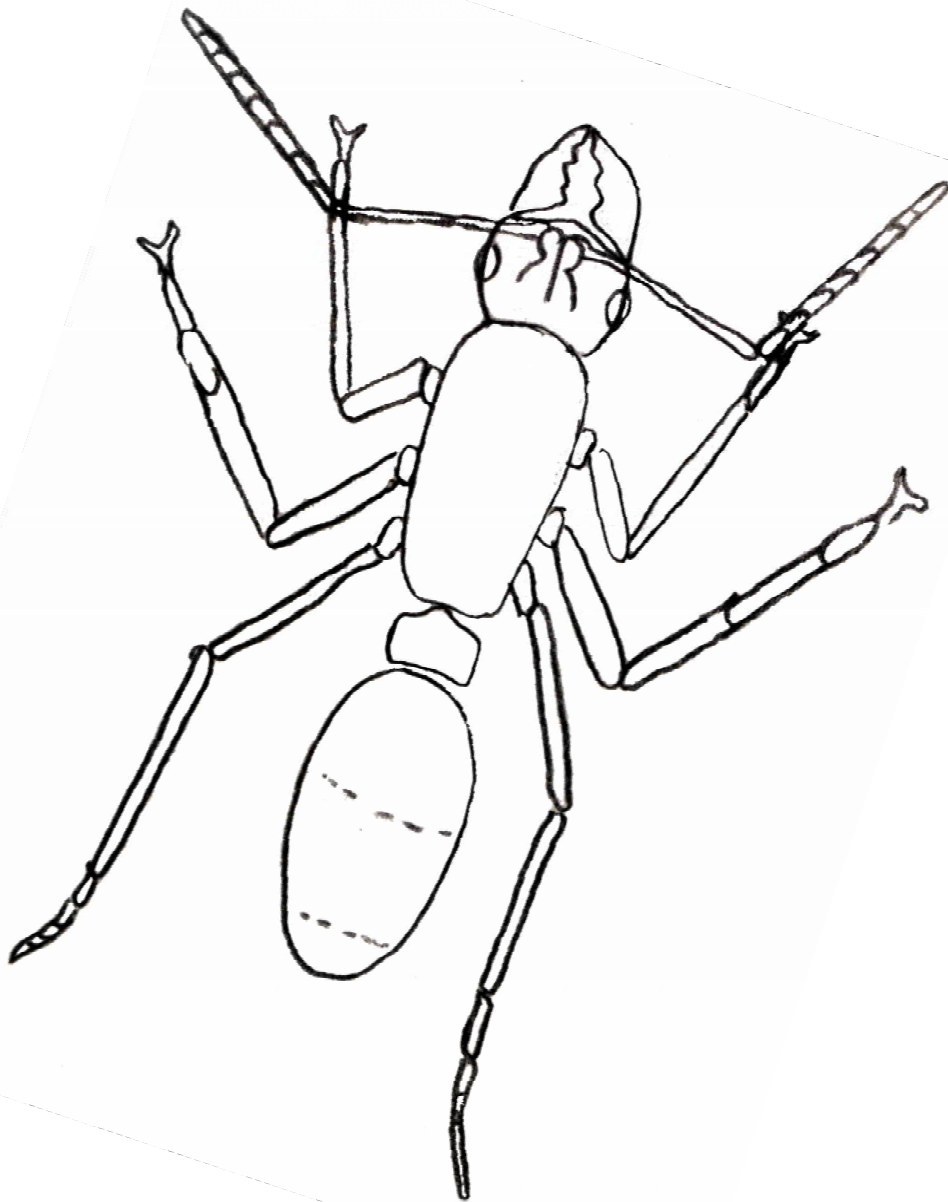
**Étude des bases chimiques et comportementales
de la formation du "visa" colonial
chez les Ponérines du genre *Pachycondyla***

Soutenue le 16 décembre 2002 devant le jury composé de:

A. LENOIR	Professeur (Université de Tours)	Président
R. BROSSUT	Directeur de Recherche au CNRS (Université de Bourgogne)	Rapporteur
J. PASTEELS	Professeur (Université Libre de Bruxelles – Belgique)	Rapporteur
D. FRESNEAU	Professeur (Université Paris XIII)	Examineur (Directeur)
J.M. JALLON	Professeur (Université Paris XI)	Examineur (Directeur)
D.B. PHO	Chargé de recherche au CNRS (Université Paris XI)	Invité d'honneur

« La vie a plus d'imagination que
n'en portent nos rêves. »

C. COLOMB



à Christelle,
à mes Parents

Remerciements

Une thèse, c'est avant tout un parcours, un chemin, une aventure parsemée d'étapes, d'épreuves, de réflexions et de rencontres. Je ne voudrais oublier aucune des personnes qui ont participé de près ou de loin à l'avancement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mon mentor, le Docteur Dang Ba PHO, sans qui rien n'aurait été possible. Il a toujours été présent, armé de sa patience et de ses multiples connaissances pour orienter mes recherches dans la bonne direction.

Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans la présence du Professeur Jean-Marc JALLON qui non seulement a accepté de me voir débarquer dans son équipe avec des fourmis mais qui en plus a su apporter des critiques constructives pour me faire aller de l'avant. Malgré son emploi du temps constamment surchargé, il a toujours su s'intéresser à ce projet qu'il a pleinement soutenu.

Toute ma reconnaissance au Professeur Dominique FRESNEAU que j'ai rencontré en 1995 lors d'un stage à Villetaneuse et qui déjà croyait en un projet commun. Il a toujours veillé à ce que je ne manque jamais de fourmis et il a su me transmettre sa passion pour les insectes sociaux.

Je tiens à remercier le Professeur Serge LAROCHE et le Professeur Pierre JAISSON pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire respectif.

C'est un réel plaisir pour moi de pouvoir compter un remarquable expert des phéromones, le Professeur Rémy BROSSUT qui a accepté d'être rapporteur de cette thèse et dont le jugement me sera très bénéfique.

Je suis particulièrement honoré de compter parmi les rapporteurs de mon travail, un éminent spécialiste des fourmis en la personne du Professeur Jacques PASTEELS, son sens critique enrichira ma réflexion.

Travailler dans deux laboratoires en même temps a été une expérience très enrichissante. Je tiens à remercier tous ceux du "Sud": Claude, Renaud, Jacques, Christine, Bruno, Helena (bon courage!), Line et bien sûr tous ceux du "Nord" Stéphane, l'ex-sudiste Fabrice, Jérôme, Antoine, Alain et Marie-Claire. Une pensée aussi pour le très regretté Yvonnick.

Je tiens à exprimer mon amitié sincère à J.L. DURAND qui a réussi l'incroyable pari de me faire apprécier les statistiques.

Un merci tout particulier à C. PEETERS qui est l'homme sans lequel je n'aurais jamais travaillé sur les fourmis.

Certains des articles présentés dans ce mémoire sont le fruit d'une collaboration avec des chercheurs étrangers, je tiens à remercier tous les membres des laboratoires d'Israël, du Brésil et d'Allemagne et tout particulièrement V. SOROKER pour son immense gentillesse et A. HEFETZ pour ses conseils.

Je n'aurais jamais pu partir en vacances sans mes "techniciens fourmis" l'incroyable Thomas, l'indispensable Gaëlle, la gentille Sandrine et la sociologue Sophie. Cette liste ne serait pas complète sans Charlotte avec qui les premiers contacts furent difficiles mais finalement amicaux. Merci pour vos sueurs froides durant l'élevage.

Merci à mes étudiants Cécile, Aurélien, Bertrand et Sophie à qui j'ai essayé d'insuffler ma soif de connaissances même si cela n'a pas toujours été facile. Je leurs souhaite de continuer dans la voie qu'ils ont choisie.

Je tiens à remercier les militaires du BLTA le colonel A. BRILLOUET-BREYNE, le commandant A. JAOUEN, Mon capitaine G. BAUZERAND et l'adjudant chef COUSQUER qui, durant mon année de service national, ont su m'écouter et m'encourager en me donnant bien souvent des permissions "à titre exceptionnel bien sûr!" pour que je puisse continuer à élever mes fourmis et à suivre les colloques scientifiques.

Il y a aussi les personnes que l'on rencontre par hasard et qui vous font confiance C. DERBIN qui m'a donné sa fibre d'enseignant, L. VINCENT qui m'a permis d'obtenir plus d'indépendance et mon parrain à l'union internationale pour l'étude des insectes sociaux, A. ROJO DE LA PAZ. Qu'ils sachent que je les remercie profondément.

Bien évidemment, je n'oublierai sous aucun prétexte mes parents et ma belle famille qui m'ont toujours énormément soutenu et qui m'ont toujours encouragé. Ils ont compris les nombreux sacrifices que j'ai dû faire pour mon travail et ils n'ont jamais relâché leur attention à mon égard. Mon frère et mes grands parents qui sont tellement fiers de mon travail.

Enfin, je ne saurais trouver les mots justes en ce qui te concerne, toi, celle qui partage ma vie et qui sait si bien me faire partager la sienne, Christelle, je te remercie tout simplement d'être présente.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Formicidae	2
Eusocialité	4
Reconnaissance de parentèle	8
Phéromones	10
Hydrocarbures	12
"Visa" colonial: "Gestalt" ou modèle génétique individualistique ?.....	14
Objectif général	16
 METHODOLOGIE GÉNÉRALE (compléments)	 20
Analyses statistiques	20
 CHAPITRE I: Description et différentiation de trois espèces proches du genre	
<i>Pachycondyla</i>	22
Résumé de l'article 1.....	22
Article 1: A multidisciplinary approach to discriminating different taxa in the species complex <i>Pachycondyla villosa</i> (Formicidae)	23
Matériel et méthodes	24
- Fourmis	24
- Analyses statistiques	24
- Préparation des échantillons pour la Microscopie Electronique à Balayage	24
- Extraction et caractérisation des hydrocarbures cuticulaires	24
- Electrophorèses d'isozymes	25
Résultats	25
- Morphologie	25
- Biométrie	25
- Analyses chimiques	26
- Electrophorèses d'isozymes	29
Discussion	29
Annexes	34
1a: Caryotypes	34
1b: Autres critères de distinction: réponses comportementales, profils chimiques de la PPG et quantités d'hydrocarbures	37

CHAPITRE II: Test comportemental du rôle des hydrocarbures impliqués

dans la reconnaissance coloniale _____ 44

Résumé de l'article 2	44
Article 2: Specific recognition behaviours elicited by cuticular hydrocarbons in ants: a new ethological test	45
Matériel et méthodes	50
- <i>Espèces étudiées</i>	50
- <i>Système d'immobilisation</i>	50
- <i>Procédures</i>	51
- <i>Extraction et purification des classes d'hydrocarbures</i>	51
Résultats	54
- <i>Comportements observés</i>	54
- <i>Réponses comportementales de chaque espèce</i>	54
A- <i>Comparaisons aux trois niveaux d'interaction</i>	54
B- <i>Confrontation de chaque espèce aux deux autres</i>	56
- <i>Impact des extraits chimiques sur le comportement de P. subversa</i>	56
Discussion	61
Annexes	66
2a: Description des différents items comportementaux observables avec le système d'immobilisation	66
2b: Réponses comportementales des ouvrières de <i>P. subversa</i> (complément)	68

CHAPITRE III: Circulation des hydrocarbures et mise en place de

l'odeur coloniale à l'échelle individuelle _____ 71

Résumé de l'article 3	71
Article 3: Purification of Lipophorin from the Ant <i>Pachycondyla villosa</i> and Comparison between Postpharyngeal Gland, Cuticle and Lipophorin Hydrocarbons	72
Matériel et méthodes	76
- <i>Fourmis</i>	76
- <i>Extraction et caractérisation des hydrocarbures cuticulaires</i>	76
- <i>Collecte des protéines de l'hémolymphe</i>	77
- <i>Purification de la lipophorine</i>	77
- <i>Extraction lipidique de la lipophorine</i>	78
- <i>Analyses statistiques</i>	78
Résultats	80
- <i>Purification de la lipophorine</i>	80
- <i>Profil hydrocarboné de la lipophorine et de la cuticule</i>	80
- <i>Profil hydrocarboné de la lipophorine et de la glande postpharyngienne</i> ...	80
Discussion	85
Annexes	96
3a: Capacité de biosynthèse de la PPG	96
3b: Comparaison des profils hydrocarbonés cuticule/PPG (complément)	99
3c: Quantification des hydrocarbures	127

CHAPITRE IV: Circulation des hydrocarbures et homogénéisation de l'odeur coloniale à l'échelle du groupe _____130

Résumé de l'article 4.....	130
Article 4: The significance of within-group hydrocarbons distribution for workers of <i>Pachycondyla apicalis</i>	131
Matériel et méthodes	135
- Récolte et élevage des fourmis	135
- Technique impliquant les radioéléments	135
- Mesures morphologiques	135
- Interactions inter-individuelles	137
- Analyses statistiques	137
Résultats	139
- Biosynthèses	139
- Transfert de la radioactivité entre les membres du groupe	139
- Interactions comportementales entre les membres du groupe	139
- Analyse comparative de la dynamique de transfert des hydrocarbures radioactifs	141
Discussion.....	142

CONCLUSION GÉNÉRALE _____147

RÉFÉRENCES (compléments) _____151

INTRODUCTION GÉNÉRALE

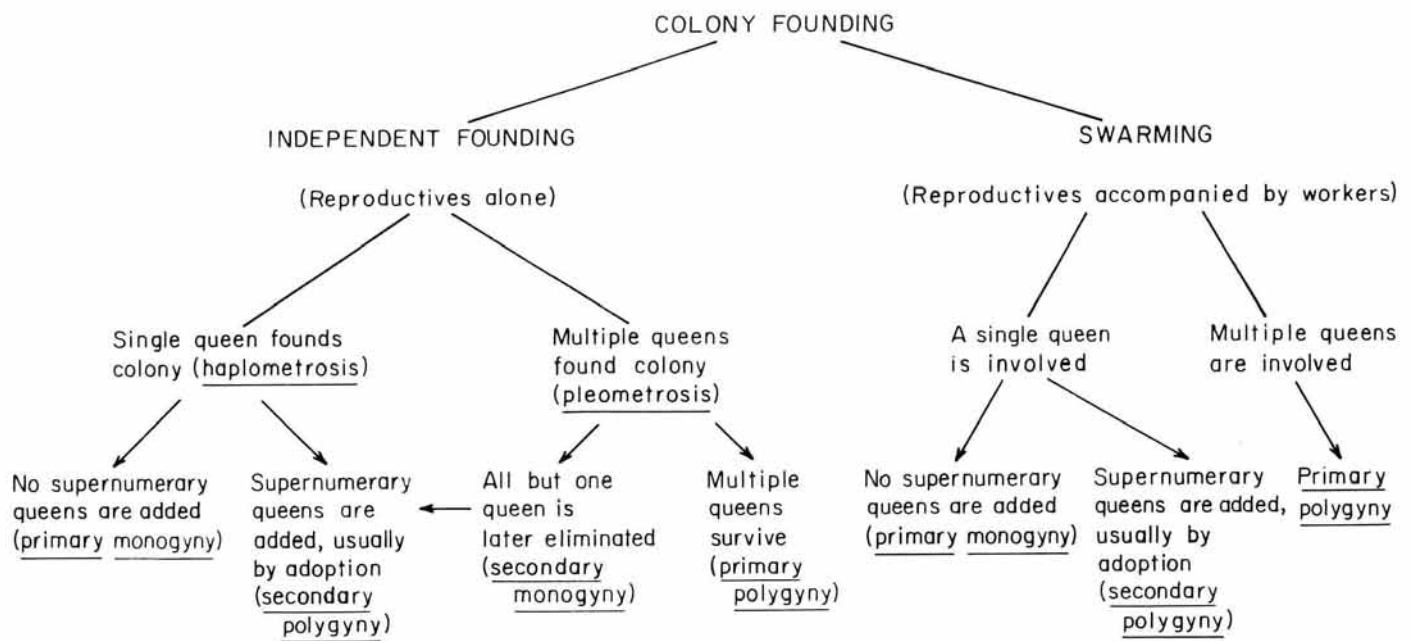


Figure 1: Le cycle de vie de base est modifié pour chaque espèce de fourmi par des variations du mode de fondation des colonies et par le nombre d'œufs pondus par les reines qui cohabitent durant les différentes étapes de leur cycle de vie. Ce diagramme présente les différentes possibilités de ces cycles de vie, ainsi que les noms qui leur correspondent (d'après Hölldobler & Wilson, 1977).

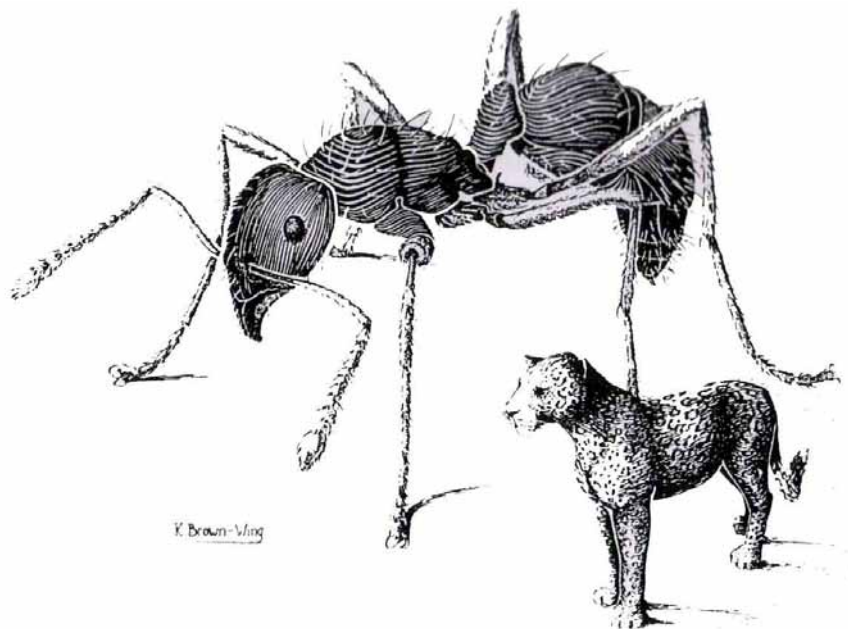


Figure 2: Le poids des fourmis et le poids des vertébrés: la taille de cette fourmi sud-américaine *Gnamptogenys pleurodon*, par rapport au jaguar, sert à illustrer le fait qu'en forêt amazonienne la biomasse des fourmis est environ quatre fois supérieure à celle des vertébrés terrestres dans leur ensemble (amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères) (d'après Jaisson, 1993).

Introduction Générale

Les Formicidae:

Apparues il y a environ 140 millions d'années, les fourmis représentent le groupe d'insectes sociaux le plus diversifié de la super-famille des Hyménoptères. Leur morphologie, leur cycle de vie et leur adaptation à l'environnement terrestre présentent en effet une grande hétérogénéité (Fig. 1). La taille des individus varie entre un millimètre et 6 centimètres (cas de la reine chez les magnans). La longévité d'une ouvrière est de 1 à 2 ans, celle d'un mâle de quelques mois et celle d'une reine peut s'élever jusqu'à 18 ans (Tabl. 1). Elles constituent un groupe d'organismes dominants dans les écosystèmes terrestres et sont aussi bien terricoles qu'arboricoles. Cette grande diversité est associée à une large distribution dans la quasi-totalité des écosystèmes de la planète (jungle équatoriale, zones tempérées, toundras arctiques, ...). Bernard (1972) a noté que 96,4 à 99,7% de la faune des invertébrés dans le Grand Erg saharien en Algérie sont constitués de fourmis. Elles représentent en ville un insecte sur deux. Avec un nombre d'espèces compris entre 9 000 et 12 000, on estime à 10 millions de milliards le nombre d'individus. Hölldobler & Wilson (1990) estiment que les fourmis représentent 10 à 15 % de la biomasse animale, toutes espèces confondues. En Amazonie, leur biomasse est 4 fois supérieure à celle de tous les vertébrés terrestres (Fig. 2). Différentes estimations de la richesse de la faune myrmécologique portant sur les mêmes échantillons de surface dans les forêts tropicales d'Amérique convergent vers les mêmes chiffres, à savoir 272 espèces rangées dans 63 genres dans l'état de Sao Paulo (Kempf, 1964), 350 espèces rangées dans 71 genres en Amazonie péruvienne (Hölldobler & Wilson, 1990). Dans la même région, Wilson (1988) a dénombré 128 espèces et 43 genres sur un seul arbre. D'autres résultats quantitatifs révèlent des chiffres records sur l'île d'Hokkaido; Higashi & Yamauchi (1979) ont étudié les super-colonies de *Formica yessensis* qui comptent jusqu'à 45 000 nids interconnectés comprenant 306 millions d'ouvrières et 1 million de reines, réparties sur une surface de 2.7 km². Ce succès écologique indéniable est certainement dû à la singularité de leur organisation sociale à savoir l'eusocialité.

Tableau 1: Longévité de différentes espèces de fourmis. Seules les adultes y sont représentés, les autres stades ont une longévité de un à quelques mois (d'après Hölldobler et Wilson, 1990).

Species	Caste	Locality	Average longevity or range	Maximum recorded longevity	Authority	Comments
<i>Aphaenogaster rudis</i>	Queen	United States	8.7 yrs	4.6–13 yrs	Haskins (1960)	Based on 11 queens in laboratory nests
<i>A. rudis</i>	Worker	United States	?	>3 yrs	Fielde (1904b)	
<i>Atta sexdens</i>	Queen	Guyana	?	14 yrs	K. M. Horton and E. O. Wilson (unpublished)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>A. sexdens rubropilosa</i>	Queen	Brazil	?	15.3 yrs	Autuori (1950b)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>Camponotus consobrinus</i>	Queen	Australia	>7 yrs		B. Hölldobler (unpublished)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>C. herculeanus</i>	Queen	Germany	?	>10 yrs	B. Hölldobler (unpublished)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>C. lateralis</i>	Queen	Italy	8 yrs		K. Hölldobler (unpublished)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>C. lateralis</i>	Queen	France	>5 years		Palma-Valli and Délye (1981)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>C. perthiana</i>	Queen	Australia	?	21 yrs	Haskins and Haskins (personal communication)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>Ectatomma ruidum</i>	Queen	Australia	?	8.8 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>E. ruidum</i>	Queen	?	?	9 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>Formica rufibarbis</i>	Queen	Germany	?	14 yrs	H. Appel (in Kutter and Stumper, 1969)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>F. sanguinea</i>	Queen	Germany	?	20 yrs	H. Appel (in Kutter and Stumper, 1969)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>Lasius alienus</i>	Queen	France	?	9.25 yrs	Janet (1904)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>L. flavus</i>	Queen	Germany	18 yrs	18 yrs	H. Appel (in Kutter and Stumper, 1969)	Based on 3–4 queens in laboratory nests
<i>L. flavus</i>	Queen	England	?	22.5 yrs	Prescott (1973)	
<i>L. niger</i>	Queen	Germany	?	29 yrs	H. Appel (in Kutter and Stumper, 1969)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>Leptothorax lichtensteini</i>	Worker	France	2.5 yrs	?	Plateaux (1986)	Based on laboratory observations
<i>L. lichtensteini</i>	Queen	France	?	12–15 yrs	Plateaux (1986)	Based on laboratory observations
<i>L. nylanderii</i>	Worker	France	3 yrs	?	Plateaux (1986)	Based on laboratory observations
<i>L. nylanderii</i>	Queen	France	?	15 yrs	Plateaux (1986)	Based on laboratory observations
<i>Messor semirufus</i>	Queen	Lebanon	?	9 yrs	Tohmé and Tohmé (1978)	
<i>Monomorium pharaonis</i>	Queen	England	?	39 wks	Peacock and Baxter (1950)	
<i>M. pharaonis</i>	Worker	England	?	9–10 wks	Peacock and Baxter (1950)	
<i>Myrmecia gulosa</i>	Worker	Australia	1.7 yrs	1.3–2.2 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 3 workers in laboratory nest
<i>M. nigriceps</i>	Worker	Australia	2.2 yrs	2.1–2.4 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 2 workers in laboratory nest
<i>M. nigrocincta</i>	Worker	Australia	1.2 yrs	1.1–1.3 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 5 workers in laboratory nest
<i>M. pilosula</i>	Worker	Australia	1.3 yrs	1.12–1.6 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 6 workers in laboratory nest
<i>M. vindex</i>	Worker	Australia	1.9 yrs	1.4–2.6 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 5 workers in laboratory nest
<i>Myrmecocystus mimicus</i>	Queen	United States	?	>11 yrs	B. Hölldobler (unpublished)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>Myrmica rubra</i> (= <i>laevinodis</i>)	Worker	England	?	2 yrs	Brian (1951b)	
<i>Odontomachus</i> sp.	Queen	?	?	4 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 2 queens in laboratory nests
<i>Pogonomyrmex badius</i>	Queen	Florida, USA	?	17 yrs	K. M. Horton and E. O. Wilson (unpublished)	Inferred from colony longevity in laboratory
<i>P. owyheei</i>	Queen	Idaho, USA	17 yrs	30 yrs	Porter and Jorgensen (1988)	Age of colonies in the field; evidence presented that colonies last only as long as founding queen
<i>Rhytidoponera purpurea</i>	Worker	Australia	2.6 yrs	2.1–2.8 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 4 workers in laboratory nest
<i>R. purpurea</i>	Queen	Australia	12.5 yrs	12.5 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>R. purpurea</i>	Queen	?	?	12 yrs	Haskins and Haskins (1980)	Based on 1 queen in laboratory nest
<i>Solenopsis invicta</i>	Worker	United States	10–70 weeks	97 weeks (17°C)	Porter and Tschinkel (1985 and personal communication)	Based on many workers in laboratory nests; depends on temperature and worker size
<i>S. invicta</i>	Queen	United States	5.8–6.8 yrs (by locality)	—	Tschinkel (1987b)	Based on sperm depletion curves from 97 queens
<i>Stenamma westwoodi</i>	Queen	England	?	17 or 18 yrs	Donisthorpe (1936)	Based on 1 queen in laboratory nest

L'eusocialité:

La socialité chez l'insecte est l'une des formes d'adaptation à l'environnement les plus remarquables du règne animal. Il ne faut pas confondre cette organisation sophistiquée avec d'autres regroupements d'animaux, dont la grégarité n'est due qu'à des phénomènes de protection collective, de migration, de reproduction ou d'abondance de nourriture. Ainsi, les sociétés supérieures d'insectes sont-elles caractérisées par trois critères (Michener, 1969; Wilson, 1971; Michener, 1974; Michener & Brothers, 1974) (Tabl. 2):

- les individus d'une même société coopèrent pour élever les jeunes,
- il existe un chevauchement des générations, si bien que les descendants assistent leurs parents dans l'élevage des jeunes,
- il existe une division du travail pour la reproduction avec des castes spécialisées morphologiquement différentes (les individus stériles étant appelés ouvrières).

Tableau 2: Les degrés de la socialité. Le passage de la vie solitaire à la vie eusociale évoluée est marqué par l'apparition de paramètres de complexité croissante. (d'après Aron & Passera, 2000).

Paramètres de la socialité	Solitaire	Grégaire	Subsocial	Colonial	Communal	Eusocial primitif	Eusocial évolué
Interattraction		+	+	+	+	+	+
Comportements parentaux			+	+	+	+	+
Site d'élevage commun				+	+	+	+
Coopération dans les soins aux jeunes					+	+	+
Elevage communautaire des jeunes/spécialisation des tâches						+	+
Individus spécialisés dans la reproduction (castes)							+

Tableau 3: Distribution taxonomique des espèces d'insectes eusociaux (Crozier & Pamilo, 1996).

	Family	Subfamily	Eusocial species
Hymenoptera,	Aculeata		
	Anthophoridae		In seven genera in the tribe Allodapini
	Apidae	Apinae (honey-bees)	Six highly eusocial species
		Bombinae (bumble-bees)	300 primitively eusocial species and their social parasites.
		Euglossinae (orchid bees)	None
		Meliponinae (stingless bees)	200 eusocial species
	Halictidae		In six genera of the tribes Halictini and Augochlorini
	Sphecidae		<i>Microstigmus</i>
	Vespidae	Polisitinae	Over 500 species, all eusocial
		Stenogastrinae	Some primitively eusocial species
		Vespinae	ca. 80 species, all eusocial
	Formicidae	11 subfamilies	ca. 8800 described species, all highly eusocial or descended from highly eusocial species
	Many other families		None
Isoptera			(All species eusocial)
Lower termites	Hodotermitidae		16 species
	Indotermitidae		6 species
	Kalotermitidae		332 species
	Mastotermitidae		1 species
	Rhinotermitidae		204 species
	Serritermitidae		1 species
	Stylotermitidae		28 species
	Termopsidae		16 species
Higher termites	Termitidae		1685 species
Homoptera	Pemphigidae		Sterile soldiers in six genera
Coleoptera	Curculionidae		<i>Austroplatypus incomptus</i>
Thysanoptera	Phlaeothripidae		Subfertile soldiers in <i>Oncothrips</i>

Tableau 4: Coefficients de corrélation génétique r chez les organismes haplodiploïdes et diploïdes. La flèche indique le sens de la relation. Chez les organismes haplodiploïdes les mâles sont issus d'œufs non fécondés et n'ont donc pas de père (d'après Aron & Passera, 2000).

		Organismes haplodiploïdes	Organismes diploïdes
Mère	→ Fille	0,5	0,5
Mère	→ Fils	0,5	0,5
Père	→ Fille	1	0,5
Fille	→ Père	0,5	0,5
Père	→ Fils	/	0,5
Sœurs	→ Sœurs	0,75	0,5
Soeur	→ Frère	0,25	0,5
Frères	→ Frères	0,5	0,5
Femelle	→ Petit-Fils	0,25	0,25
Femelle	→ Neveu ou Nièce	0,375	0,25

Parmi les groupes d'insectes eusociaux, les Formicidae possèdent le plus grand nombre de genres connus, 296 genres (Wilson, 1971) répartis dans 15 sous-familles (Bolton, 1994). Les autres groupes sont beaucoup moins nombreux, on y trouve notamment les termites (Isoptera), les abeilles, les bourdons, une partie des guêpes (Hymenoptera) ainsi que 3 cas particuliers de Pemphigidae (Homoptera), de Curculionidae (Coleoptera) et de Phlaeothripidae (Thysanoptera) (Tabl. 3).

L'aspect de la socialité qui a le plus surpris les scientifiques est l'omniprésence de comportements altruistes chez ces insectes. En effet, la théorie de l'évolution mise en place par Darwin (1859), conclut que la sélection naturelle favorise les individus dont la stratégie de reproduction est la plus efficace. Mais alors, comment expliquer que la sélection ait pu conduire à l'apparition de sociétés dans lesquelles 95% des individus sont stériles? Comment expliquer le dévouement de certains individus pour les autres (trophallaxie, soins aux jeunes...)? Comment expliquer un altruisme poussé parfois à l'extrême? Chez les fourmis *Myrmecia* d'Australie, une reine fondatrice d'une nouvelle colonie peut donner à manger à ses larves une partie de ces ailes. Chez certaines fourmis de Malaisie, des individus "kamikazes" n'hésitent pas à se gonfler de liquide nocif et à se faire exploser au contact des ennemis afin de retarder leur marche ou de les effrayer (Hölldobler & Wilson, 1990). Darwin a alors pensé à un concept de sélection familiale, selon lequel la sélection pourrait s'appliquer à la famille aussi bien qu'à l'individu. Certains scientifiques ont comparé la colonie à un super-organisme dont les individus seraient les cellules (certaines, comme les globules blancs, n'hésitant pas à se sacrifier), ou à un "cerveau collectif" dont les individus seraient les neurones. D'autres spécialistes ont toutefois jugé ces théories comme étant un peu trop réductionnistes en effaçant l'individualité des membres de la colonie.

C'est finalement Hamilton (1964) qui, avec sa théorie de la sélection de parentèle, a donné une base génétique au problème de la socialité. Il a mis en évidence le fait que la valeur adaptative d'un individu se mesure aussi bien à son succès reproducteur individuel qu'au bénéfice indirect qu'il peut retirer de la reproduction d'un tiers, dès lors qu'il a un fort coefficient de parenté avec celui-ci et qu'il présente donc une forte proportion de gènes semblables aux siens. Ainsi, la règle de Hamilton conclut qu'un comportement altruiste aura de fortes chances d'être sélectionné si $br > c$ (avec b = bénéfice pour l'individu receveur, r = coefficient de parentèle entre les individus, c = coût de l'acte altruiste pour le donneur). Les gènes peuvent être par conséquent considérés comme "égoïstes": ils agissent dans leur propre intérêt, en jouant un rôle fondamental dans le déterminisme du comportement et de la

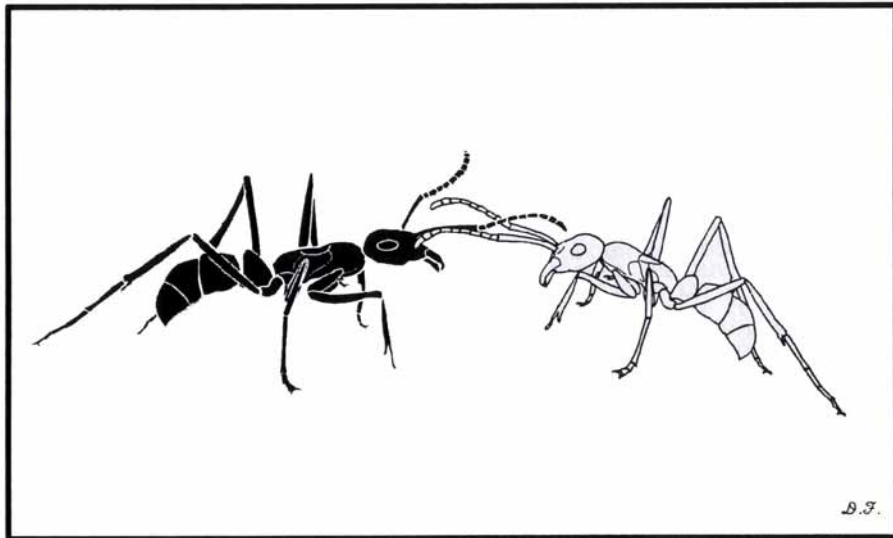


Figure 3A: Exploration antennaire de contact (Fresneau, 1994).

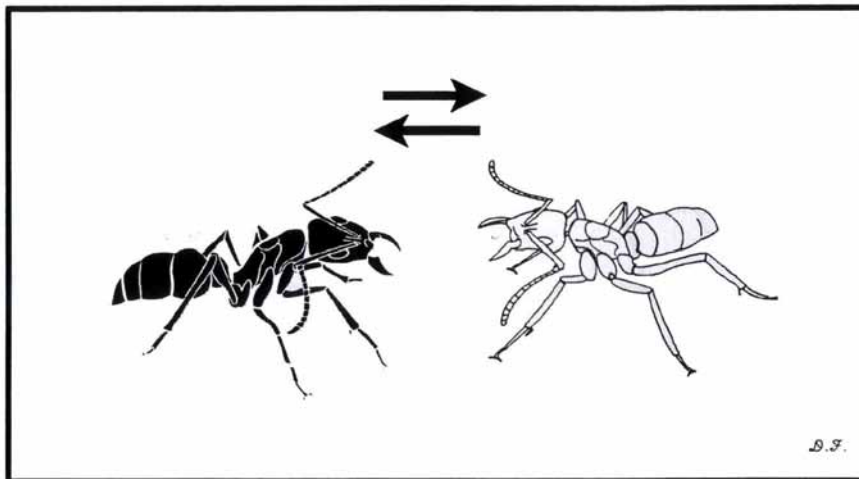


Figure 3B: Mouvement de recul et ouverture des mandibules.

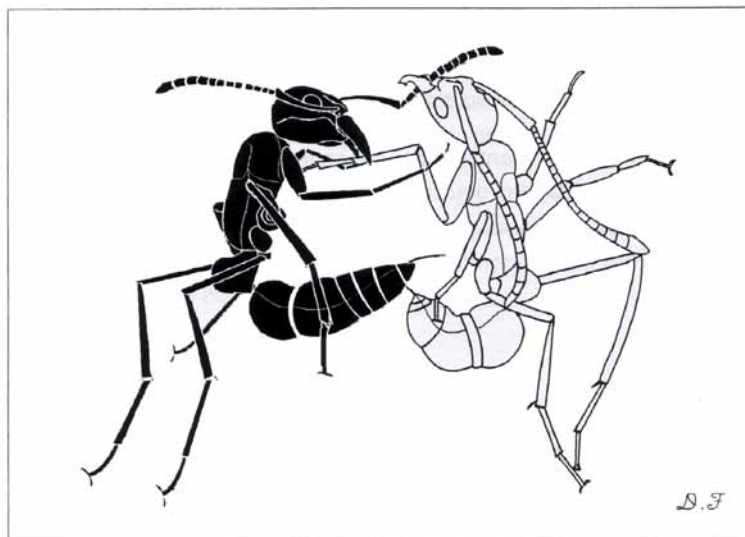


Figure 3C: Morsure et tentative de piquê.

physiologie de l'individu, même si ce n'est pas forcément dans l'intérêt de ce dernier. Les êtres vivants ne sont donc que des "outils", créés et manipulés par les gènes, dans le but d'assurer la reproduction de ces derniers. Le succès adaptatif des insectes sociaux, lié à une reproduction sociale et non individuelle, en est l'un des exemples les plus frappants.

Cette théorie a aussi permis de comprendre que chez les Hyménoptères, un rapport existe entre le déterminisme du sexe lié à l'haplodiploïdie (sauf cas particulier chez certaines espèces) et l'existence de différentes castes. En effet, l'haplodiploïdie induit des asymétries génétiques particulières entre les individus d'une même société. Entre mères et filles il y a une corrélation génétique de $\frac{1}{2}$ alors qu'entre sœurs elle est de $\frac{3}{4}$. Il est donc plus avantageux d'élever des sœurs que des filles, ce qui explique l'altruisme de reproduction (Tabl. 4).

Toutefois, la théorie de la parentèle n'explique pas tous les mécanismes de ces sociétés d'insectes. Elle n'explique pas, notamment, par quels moyens les individus possédant un haut coefficient de parenté sont capables de discriminer leurs congénères des individus étrangers.

Reconnaissance de parentèle:

L'altruisme extrême des fourmis implique de façon sous-jacente la nécessité de distinguer les individus génétiquement proches des étrangers. En effet, seuls les congénères doivent avoir accès aux réserves de nourriture, à la sécurité des individus et des jeunes. Si un individu étranger pouvait accéder à ces ressources, cela irait directement à l'encontre de la "fitness" de l'ensemble des membres de la colonie. Ainsi, lorsque deux fourmis non apparentées se rencontrent près du nid de l'une d'entre elles, il s'ensuit immédiatement un comportement agressif de défense du territoire (Fresneau, 1994). Ce comportement d'agressivité est ritualisé et comporte un certain nombre de séquences identifiables sous forme d'items comportementaux. Tout d'abord, on observe une exploration antennaire mutuelle incluant des contacts assez courts (Fig. 3A). Les antennes doivent toujours entrer en contact avec la cuticule de l'adversaire avant que n'apparaissent les premières réactions de reconnaissance ou d'agression. Après ce premier contact, si l'individu est non apparenté, on observe de brefs mouvements de recul saccadés des deux partenaires suivis d'ouvertures mandibulaires et de retraits rapides des antennes (Fig. 3B). Dans les situations les plus agressives, un combat singulier commence: les deux individus se mordent et tentent de trouver la position qui leur permettra de piquer sans être piqué (Fig. 3C). Les piqûres effectives se produisent aussi bien au bout de 30 secondes de combat qu'après une heure et ont pour cible les articulations des pattes et du thorax où la cuticule est plus fragile. Dans tous les

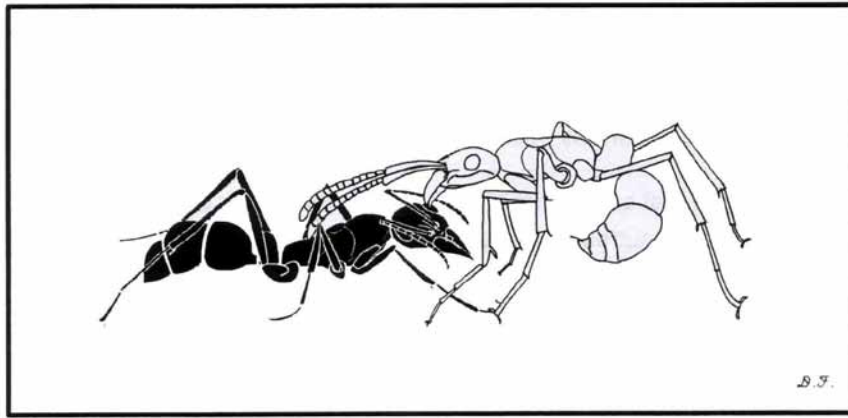


Figure 3D: Position de soumission.

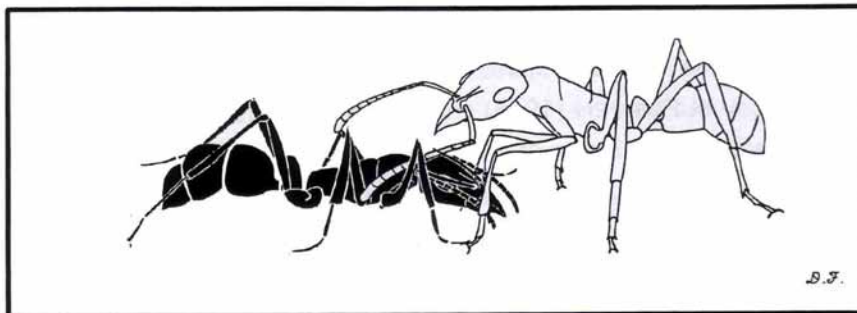


Figure 3E: Inhibition de l'agression.

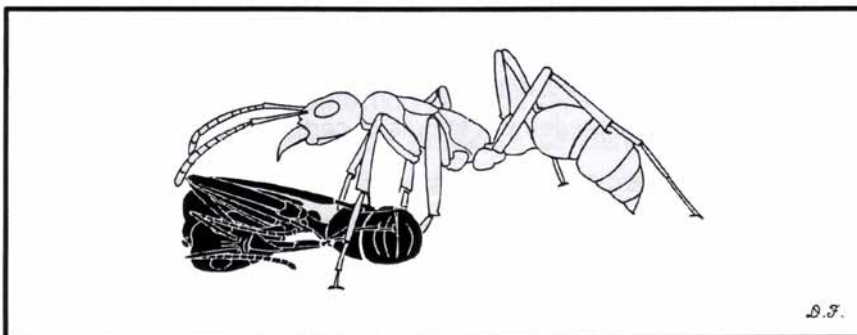


Figure 3F: Immobilisation consécutive à la soumission.

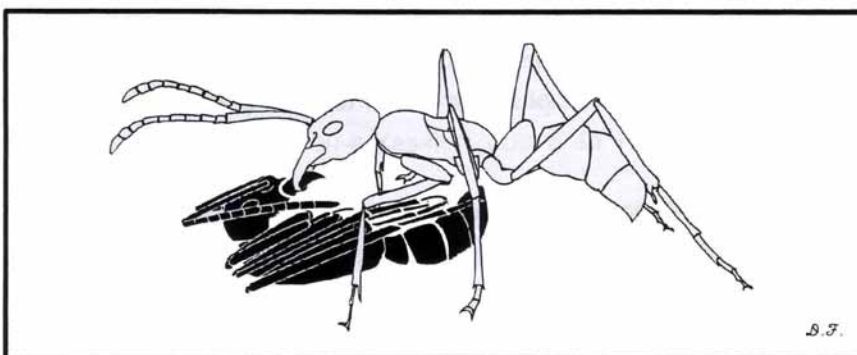


Figure 3G: Transport et éloignement de la fourmi immobilisée.

cas, la fourmi piquée meurt. Les morsures occasionnent souvent des mutilations des antennes et des pattes qui représentent aussi une importante cause de mortalité. Mais l'issue n'est pas toujours fatale; dans de nombreux cas les adversaires fuient. Dans certaines situations, on peut observer de véritables rituels de soumission. L'une des fourmis s'aplatit sur le sol, antennes repliées et mandibules fermées (Fig. 3D) ce qui a pour effet d'inhiber l'agressivité de la fourmi "dominante" (Fig. 3E). La fourmi soumise prend alors la posture typique d'une nymphe dans son cocon (Fig. 3F). La fourmi "dominante" la saisit et la transporte en l'éloignant du nid (Fig. 3G). Ces comportements de dominance/soumission apparaissent parfois entre deux fourmis apparentées (réactions comportementales typiques d'un conflit intra-colonial en vue d'établir une hiérarchisation des ouvrières), mais très rarement entre deux fourmis non apparentées. Dans ce dernier cas, ce type de comportements est observable dans un contexte de moindre agression (manœuvres d'intimidation) ou lorsque la fourmi soumise appartient à une colonie sans reine.

Lorsque la rencontre s'effectue à proximité d'un nid où un marquage territorial spécifique à la colonie est présent, le niveau d'agressivité des ouvrières "résidentes" est beaucoup plus élevé que celui des ouvrières "intruses". Par conséquent, le niveau d'agressivité des individus est fonction de deux facteurs: l'appareillement génétique des individus et la proximité du nid (Fig. 4). L'information de ces deux facteurs est codée sous la forme de messagers chimiques (Cammaerts, Morgan & Tyler, 1977; Jaffe, Lopez & Aragort, 1986; Mayade, Cammaerts & Suzzoni, 1993; Cammaerts & Cammaerts, 1998, 1999).

Phéromones:

La majorité des études, si ce n'est toutes, menées jusqu'à présent sur les fourmis montrent, en effet, que l'identification des congénères et des castes s'effectue par contacts antennaires. Ceci suggère que l'information est de nature chimique. Il est apparu que la communication chimique, pour de nombreux groupes d'animaux et tout particulièrement pour les insectes, est le mode de communication principal (Brossut, 1996). Parmi les molécules actives, deux catégories peuvent être distinguées: celles qui viennent de l'environnement et celles qui ont pour origine d'autres êtres vivants. Ces dernières sont appelées composés sémiochimiques (Fig. 5). Si les individus émetteur et récepteur sont d'espèces différentes, les substances sont qualifiées d'allélochimiques. S'ils sont de la même espèce les molécules actives sont appelées phéromones (Karlson & Lüscher, 1959). Le terme phéromone dérive du grec "*pherein*" qui signifie "transférer", "*hormon*" voulant dire "exciter". Il s'agit donc d'une

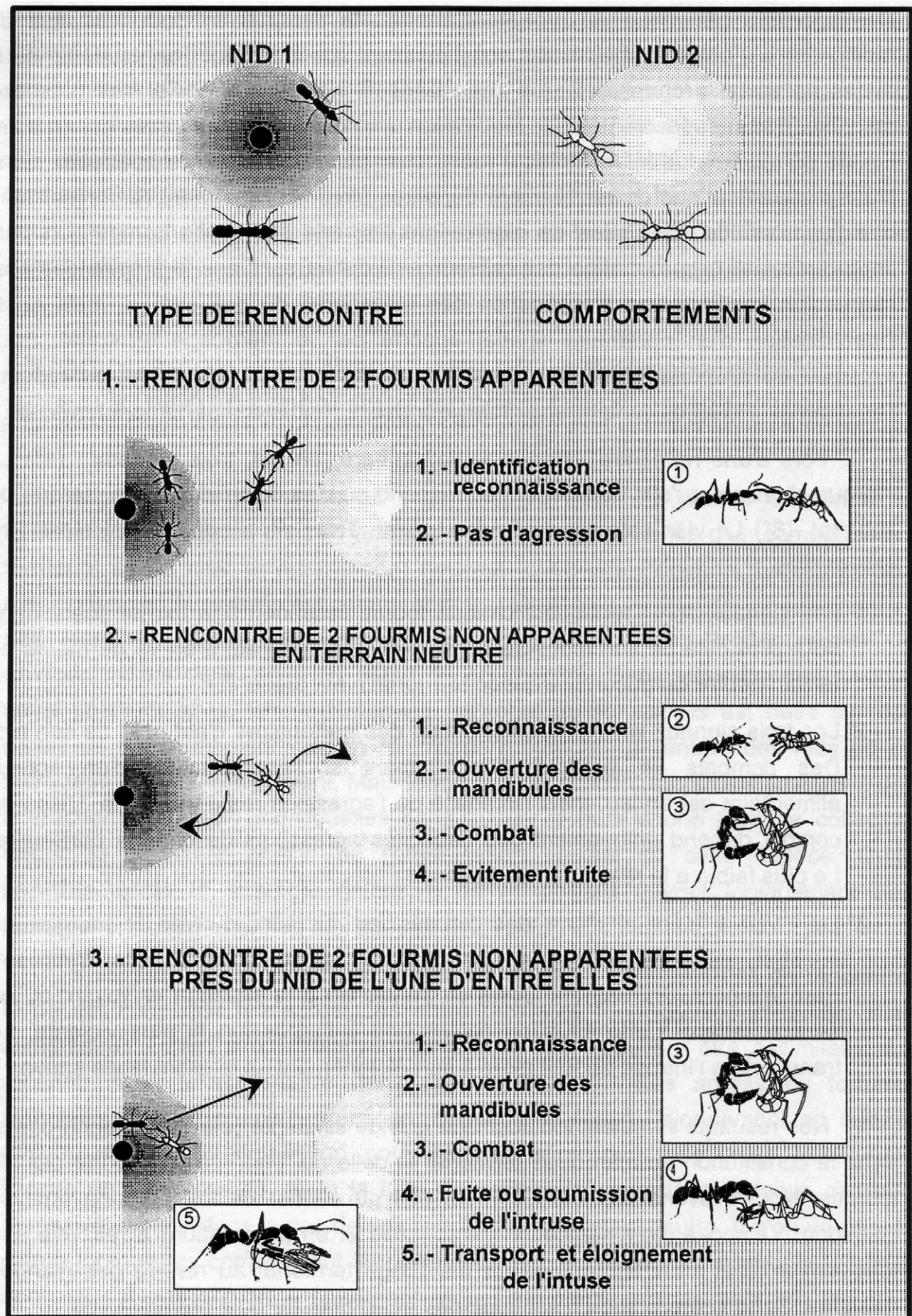


Figure 4: Diagramme synthétique reprenant les différentes situations d'agression en nature (Fresneau, 1994).

substance ou d'un mélange de substances qui, émises par un individu, déclenchent chez un congénère une modification de son comportement ou de sa physiologie. Chez les insectes sociaux, ces signaux chimiques qui permettent la reconnaissance entre les individus mais aussi la reconnaissance du statut, de l'état physiologique ou encore du territoire sont principalement des molécules hydrocarbonées (Hölldobler & Wilson, 1990).

Les hydrocarbures:

Les hydrocarbures ont deux fonctions importantes chez les insectes: la lutte contre la dessiccation et la communication chimique. De par leur propriété hydrophobe et leur organisation dans l'épicuticule, couche la plus externe de la cuticule, ils constituent une barrière efficace contre l'évaporation corporelle en eau (Noble-Nesbitt, 1991; Gibbs, 1998; Rouault, Capy & Jallon, 2000; Young *et al.*, 2000). D'autre part, leur implication dans la communication chimique est à l'origine de nombreux comportements aussi bien chez les insectes solitaires que sociaux: parade sexuelle (Pennanec'h *et al.*, 1995; Singer, 1998), isolement reproducteur (Blomquist, Nelson & De Renobales, 1987; Chase *et al.*, 1992; Ferveur & Jallon, 1996), communication insectes-plantes (Eigenbrode & Espelie, 1995), interactions prédateurs-proies (Howard, 1993), mimétisme chimique (Dettner & Liepert, 1994), reconnaissance de l'espèce/colonie/caste (Vander Meer & Morel, 1998; Lenoir *et al.*, 1999) et signal de fertilité (Monnin, Malosse & Peeters, 1998; Cuvillier-Hot *et al.*, 2002; Heinze, Stengl & Sledge, 2002).

Ces molécules hydrocarbonées sont produites par l'insecte et recouvrent toute la surface cuticulaire. La cuticule synthétisée par les cellules de l'épiderme est composée de protéines et de chitine (polymères de N-acétylglucosamine). Elle est constituée de trois couches: l'endocuticule (interne), l'exocuticule et l'épicuticule (externe) (Fig. 6). Chez la larve, la cuticule est flexible et non colorée. Chez l'adulte, elle est rigide et colorée pour la majeure partie du corps. Afin de permettre les mouvements, les intersections entre les segments et les appendices sont plus souples. L'endocuticule est flexible et élastique tandis que l'exocuticule est responsable de la rigidité. C'est l'épicuticule qui est imperméable et qui porte les signaux chimiques impliqués dans la reconnaissance intra- et inter-spécifique. Des hydrocarbures similaires à ceux de la cuticule ont été trouvés en abondance à l'intérieur d'une glande propre aux fourmis: la glande postpharyngienne (PPG) (Fig. 7A). C'est une glande située dans la tête, au dessus du cerveau, de forme multilobée voire digitalisée chez les espèces les plus évoluées (Fig. 7B). Elle contient une grande quantité d'hydrocarbures mais aussi d'autres lipides. De

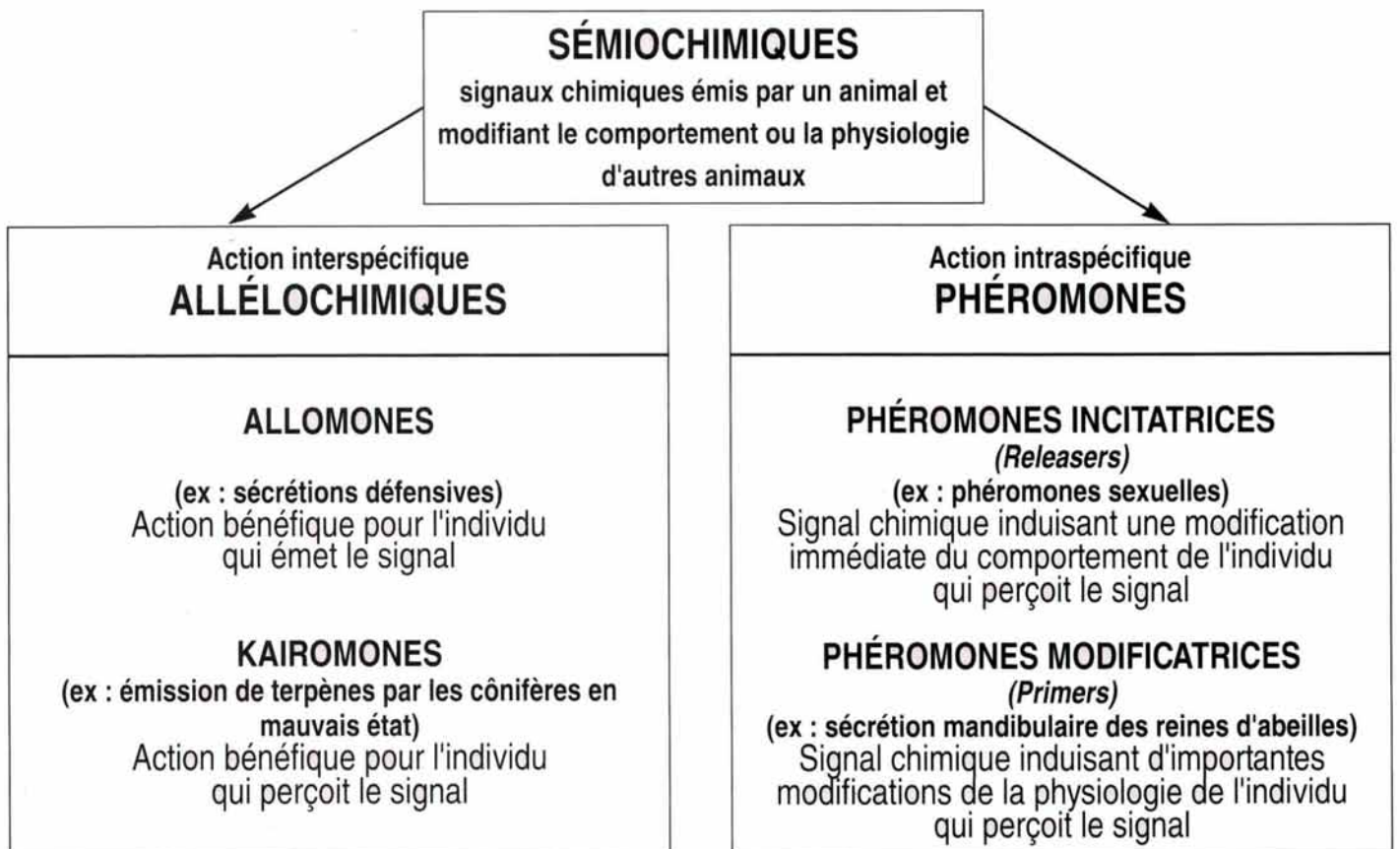


Figure 5: Signaux chimiques utilisés dans la communication intra- et inter-spécifique et modifiant le comportement ou la physiologie d'autres animaux (Brossut, 1996).

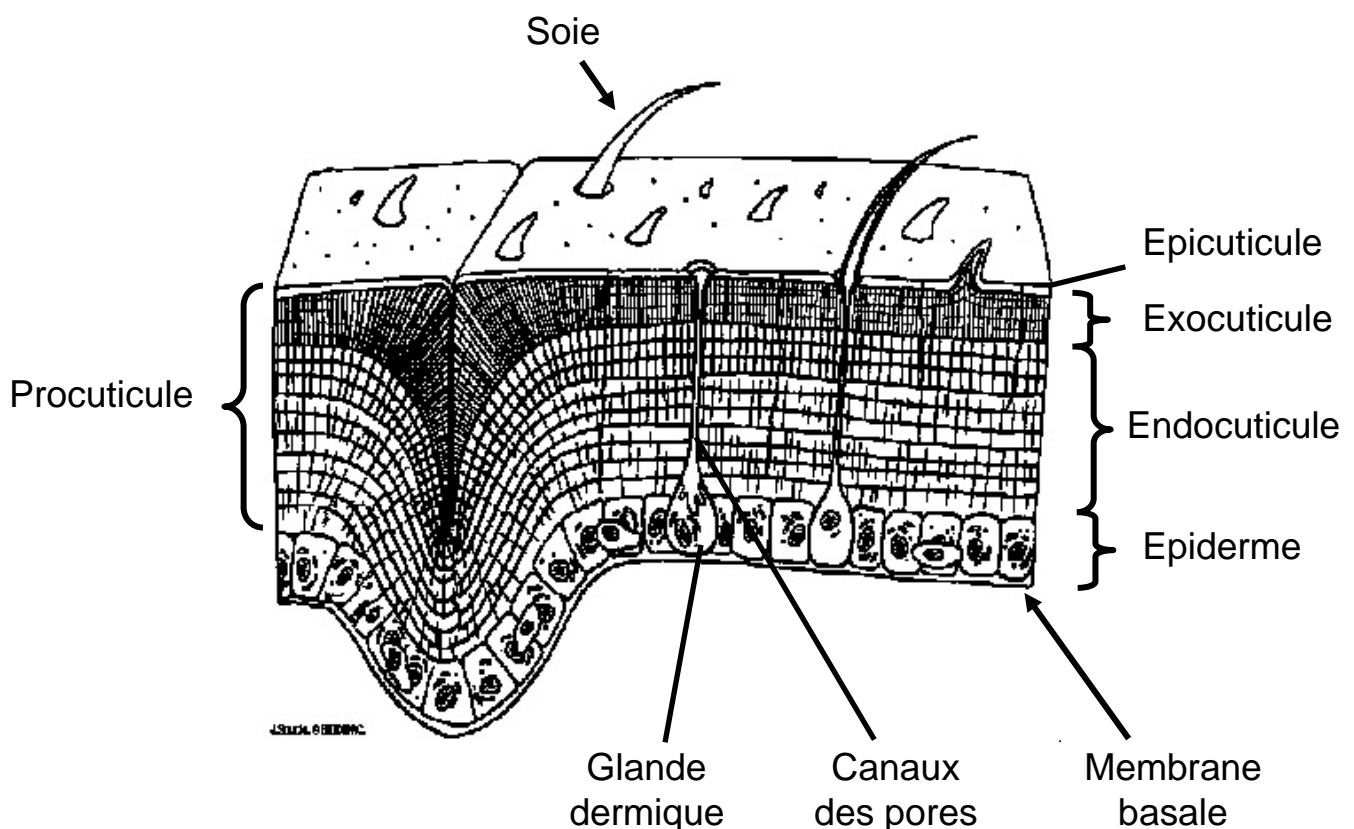


Figure 6: Schéma de la structure du tégument d'insecte.

nombreux travaux tentent de déterminer si elle joue un rôle dans les mécanismes de reconnaissance coloniale.

Les hydrocarbures sont de longues chaînes aliphatiques dont la biosynthèse est faite à partir d'acétate (Fig. 8). La synthèse d'acides gras (FAS) utilise l'acétate pour former des acides gras linéaires saturés en C14, C16 et C18 (De Renobales & Blomquist, 1984; Chan Yong & Jallon, 1986; De Renobales, Woodin & Blomquist, 1986). Puis, ces acides gras subissent des étapes d'élongation, de désaturation et de décarboxylation (Pennanec'h *et al.*, 1997; Wicker-Thomas, Henriot & Dallerac, 1997; Dallerac *et al.*, 2000). L'ensemble de cette chaîne de biosynthèse a été décrite chez les Diptères comme *Musca domestica* (Blomquist, Dillwith & Adams, 1984) et chez les Lépidoptères (Roelofs & Wolf, 1988). Chez les premiers, les segments 4 et 5 de l'abdomen interviendraient dans la régulation et/ou la production des phéromones (Jallon & Hotta, 1979; Coyne & Oyama, 1995; Wicker-Thomas & Jallon, 2001). Les hydrocarbures seraient ensuite transportés jusqu'à la cuticule par une lipoprotéine, ubiquitaire chez les insectes et circulant dans l'hémolymph, la lipophorine. Celle-ci a été décrite par de nombreux travaux chez plusieurs espèces mais jamais chez les fourmis (Pho, Pennanec'h & Jallon, 1996; Schal *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1999, et les références citées dans cet article). Les hydrocarbures qui se trouvent dans la PPG y sont-ils transportés aussi par la lipophorine ? Quel est le véritable schéma de circulation interne des hydrocarbures à l'intérieur d'un individu ?

"Visa" colonial: "Gestalt" ou modèle génétique individualistique ?

Les sécrétions continues d'hydrocarbures produisent des combinaisons phéromonales en relation avec le génome de chaque individu. Les différences inter-individuelles seraient relativement limitées dans une même colonie en raison de leur haut coefficient de parentèle. Ceci devrait logiquement introduire une relative monotonie des "motifs" chimiques ou "odeur". Toutefois, comment la colonie peut générer un signal chimique collectif à partir de caractéristiques individuelles différentes ?

Deux modèles écologiques ont été inventés pour comprendre la formation d'une odeur coloniale (ou "visa" colonial): le modèle "gestalt" ou le modèle génétique individualistique (Crozier & Dix, 1979). Le premier modèle implique un brassage des odeurs individuelles lors d'échanges sociaux intensifs tels que la trophallaxie, le comportement de toilettage social (allogrooming) ou les contacts physiques variés. Dans ce cas, chaque individu échange sa production "personnelle" d'hydrocarbures afin de tendre vers une odeur mélangée plus

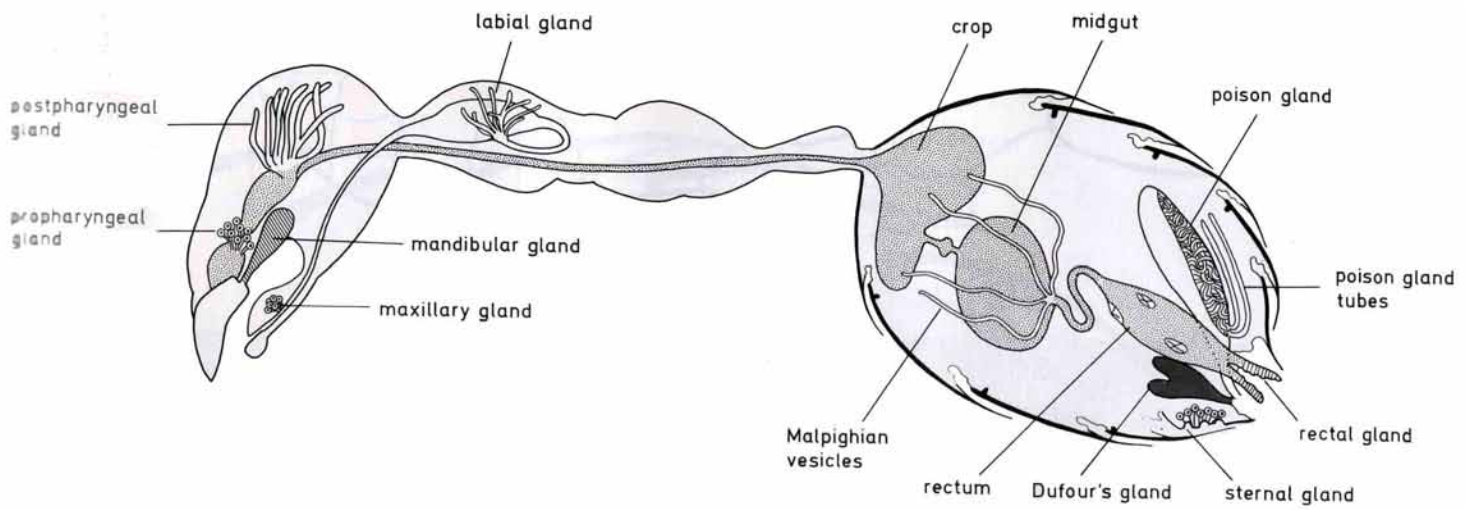


Figure 7A: Glandes exocrines des fourmis (Hölldobler & Wilson, 1990).

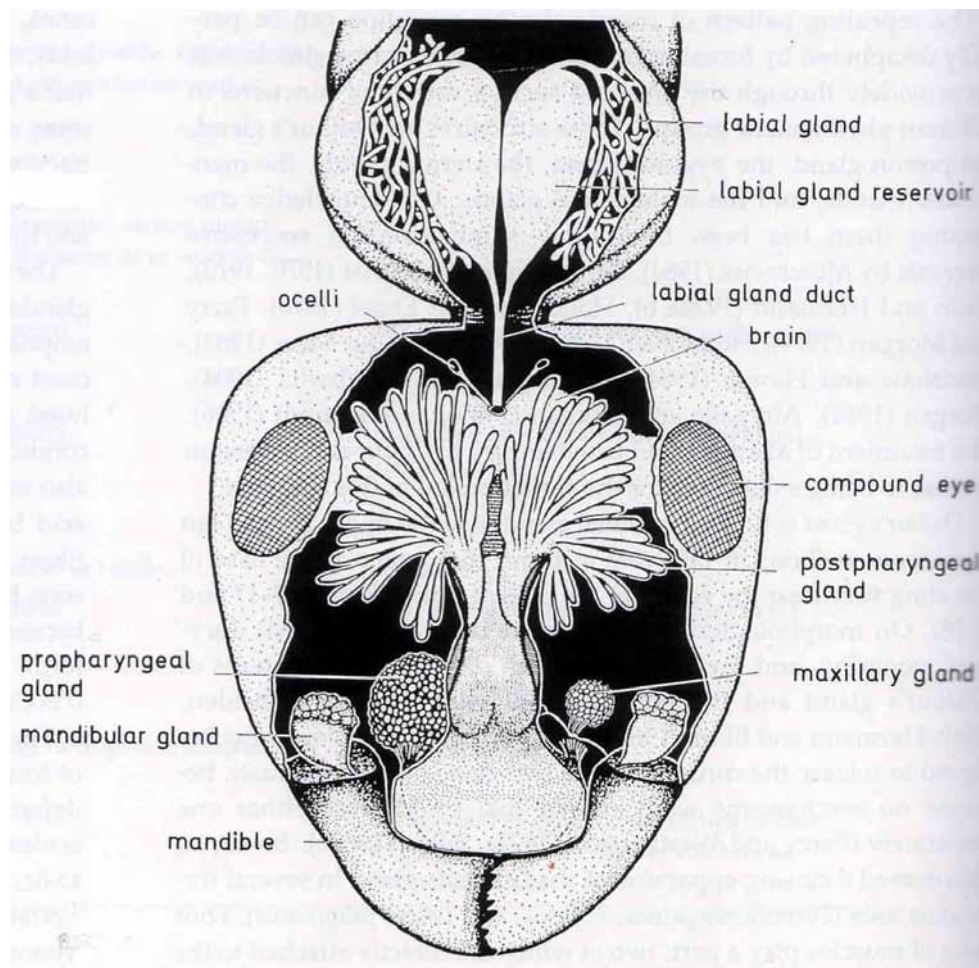


Figure 7B: Glandes exocrines des fourmis dans la tête et le thorax (vu dorsal) (Hölldobler & Wilson, 1990).

coloniale comprenant l'ensemble des odeurs de ses congénères. Chaque individu possède donc une odeur mixée qui est, par conséquent, devenue une odeur coloniale. Les congénères se reconnaissent entre eux de par leur odeur commune. L'odeur coloniale est donc partagée dès les premiers jours après l'émergence. Un individu non apparenté ou plutôt n'appartenant pas à la colonie sera rejeté car son odeur est différente. Par contre, le modèle génétique individualistique fait appel à un système de mémorisation de l'odeur de chaque individu appartenant à la colonie. Ce système nécessite une forte capacité de mémorisation ou bien un nombre limité d'individus par colonie ou de signaux chimiques, même si tous les hydrocarbures détectés ne sont pas impliqués dans la reconnaissance des apparentés.

Objectif général:

Le problème scientifique de la reconnaissance coloniale est complexe car, comme bien souvent, il est composé de multiples facteurs. Pour essayer de mieux appréhender ce système de reconnaissance, nous pouvons distinguer deux approches différentes et complémentaires. La première est l'approche comportementale qui consiste en une description minutieuse des items comportementaux observables dans les différentes situations de rencontre possibles (intra-coloniales, intra-spécifiques et inter-spécifiques). La seconde approche fait appel aux techniques d'analyse des facteurs chimiques impliqués dans la reconnaissance. Elle est composée, là encore, de multiples facteurs: les molécules impliquées dans la reconnaissance coloniale, la reconnaissance de la caste ou de l'individu sans parler de l'aspect de la territorialité qui représente un sujet certes imbriqué mais séparé. Les hydrocarbures utilisés par les insectes dans la reconnaissance con- et hétéro-spécifique sont aussi utilisés par les humains en chimie analytique afin de différencier les espèces d'insectes. Les possibilités de branchements méthyliques et de localisations des doubles liaisons combinées à la longueur de chaînes des hydrocarbures conduisent à une pléthore de caractères chimiques pour les chemotaxonomistes d'insectes. Cependant, ces études restent la plupart du temps limitées à une description chimique de la composition de la signature. On peut donc s'interroger sur le rôle exact de chacun des hydrocarbures contenus dans ces mélanges d'hydrocarbures finement régulés par les organismes (puisque spécifiques). Existe-t-il une signification particulière pour chacun de ces hydrocarbures? Sont-ils de véritables marqueurs du statut de l'individu, de l'apparentement génétique ou encore de l'activité de l'individu au sein du groupe auquel il appartient? Le moyen le plus adapté pour déterminer le rôle de chaque hydrocarbure est donc d'entreprendre une analyse comparative de plusieurs espèces dites "primitives" avec un niveau

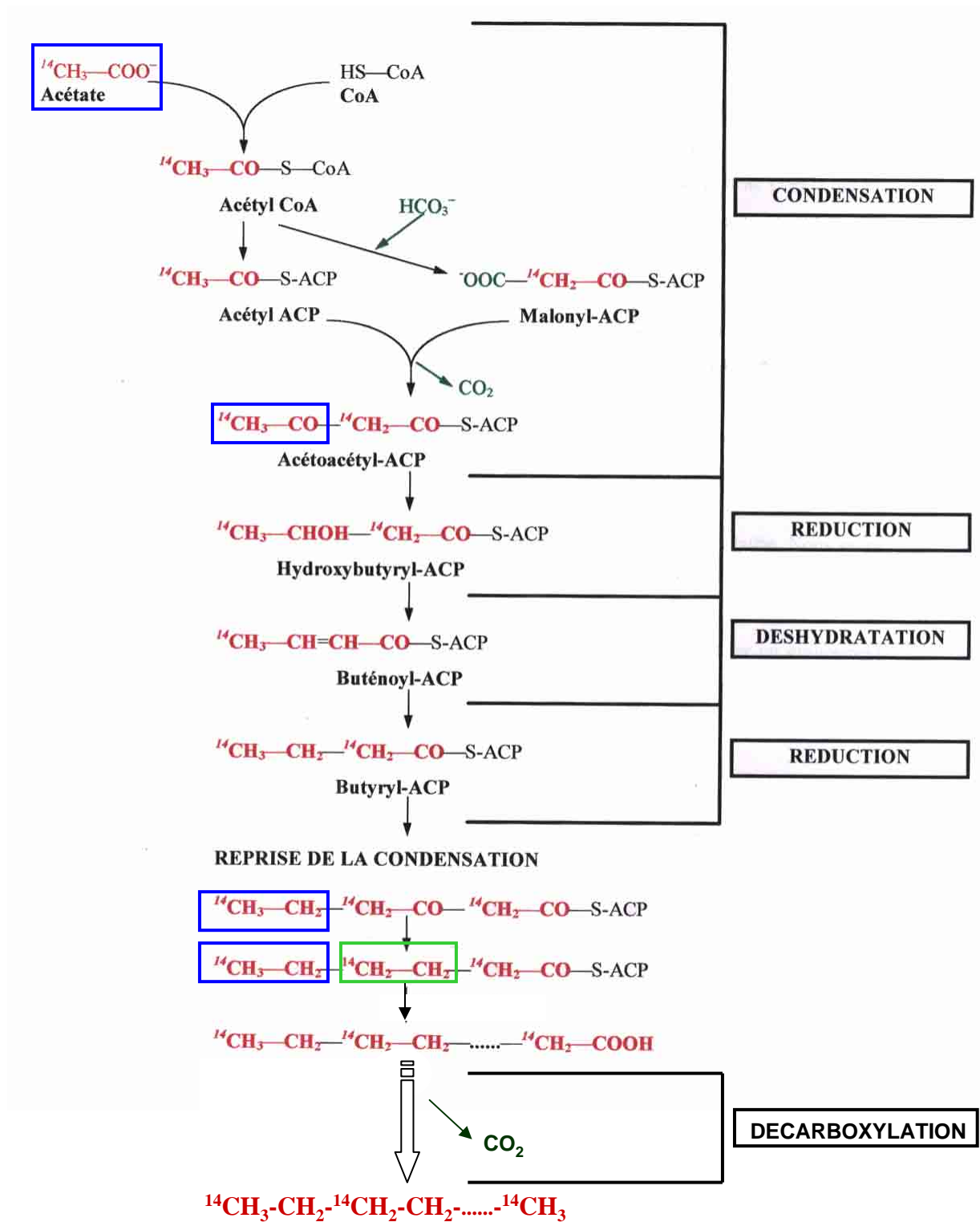


Figure 8: Chaîne de biosynthèse des hydrocarbures.

d'interactions sociales faibles afin d'organiser des rencontres comportementales selon les 3 niveaux d'interaction (intra-colonial, intra-spécifique et inter-spécifique) (Fig. 9). C'est pourquoi, nous avons travaillé sur trois espèces proches de Ponérine du genre *Pachycondyla* qui ne font pas de trophallaxie et qui présentent un taux de toilettage mutuel (allogrooming) faible. De plus, elles constituent des sociétés avec un nombre restreint de castes et des individus de grande taille (12-15 mm) ce qui facilite la visualisation des comportements. Cette dernière caractéristique favorise également l'extraction de grandes quantités d'hydrocarbures. Enfin, elles possèdent un cycle de vie très proche tout en ayant des profils hydrocarbonés très distincts.

Un dernier aspect, différent mais lié, peut être abordé. Il s'agit de la circulation des hydrocarbures, à l'intérieur d'un individu ou entre les individus d'un groupe, afin de permettre l'obtention d'une odeur coloniale à partir d'une odeur individuelle.

Ce travail s'organise donc autour de 4 chapitres. Le premier a pour but de caractériser les trois espèces selon de nombreux facteurs taxonomiques et entre autres chimiques. En effet, nous y déterminons la signature chimique cuticulaire des hydrocarbures de trois espèces sympatriques de Ponérines: *Pachycondyla villosa*, *Pachycondyla inversa* et *Pachycondyla subversa*. Ces trois espèces montrent de grandes similitudes morphologiques et pourtant de nettes différences dans leur profil hydrocarboné cuticulaire. Ces trois espèces sont donc propices à une étude comparée dans le cadre du problème de la reconnaissance de parentèle.

Le deuxième chapitre se base sur l'utilisation d'un nouveau test éthologique permettant d'étudier en détail le comportement agressif de ces fourmis. Ce test permet d'organiser différents types de rencontre (intra-coloniale, intra-spécifique et inter-spécifique) en conditions contrôlées et sans risque de lésion physique pour les fourmis. Grâce à ce procédé, nous testons les différentes familles d'hydrocarbures cuticulaires afin d'en déterminer leur implication dans les réactions comportementales liées à la reconnaissance des apparentées.

Le troisième chapitre traite de la purification de la lipophorine, protéine qui transporte les hydrocarbures dans l'hémolymph vers différents sites. Pour la première fois chez les fourmis, nous avons caractérisé les hydrocarbures qui lui sont associés. Ces analyses permettent de compléter le schéma supposé de la circulation des hydrocarbures à l'intérieur de l'animal. De plus, nous avons analysé la composition hydrocarbonée de la PPG pour les trois espèces étudiées. La comparaison des hydrocarbures de la cuticule avec ceux de la PPG permet d'aboutir à des conclusions sur le rôle précis de certains hydrocarbures dans la lutte contre la dessiccation ou la reconnaissance coloniale.

Enfin, dans le quatrième chapitre, nous avons déterminé quelles sont les capacités réelles d'échanges d'hydrocarbures dans de petits groupes d'individus. Pour ce faire, nous avons étudié la néosynthèse des hydrocarbures en injectant un précurseur radioactif à un individu dit "donneur" mis en présence avec 10 individus "receveurs". Nous avons observé les interactions comportementales de ces individus afin de déterminer la dynamique de transfert des hydrocarbures radioactifs. Les résultats obtenus permettent de mieux cerner le schéma de circulation externe des hydrocarbures entre individus du même groupe.

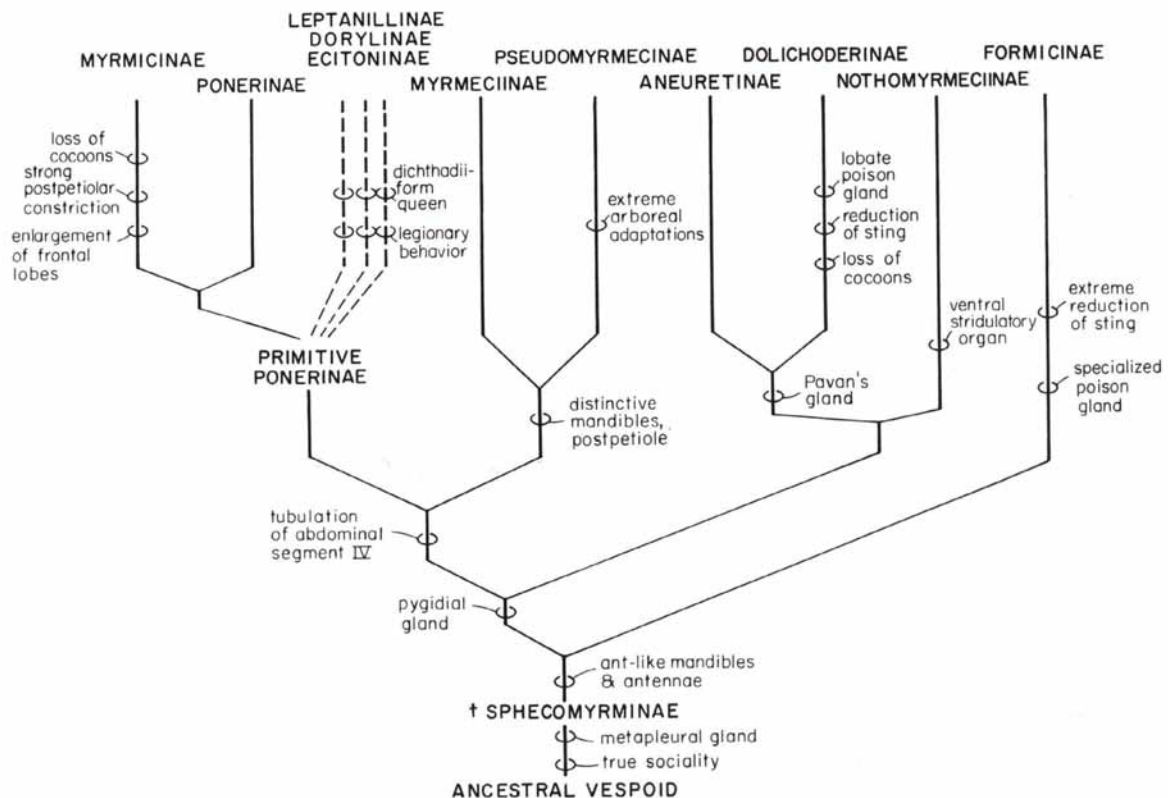


Figure 9: Phylogeny des sous-familles de Formicide (selon Hölldobler & Wilson, 1990).

MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

(compléments)

Méthodologie Générale

(compléments)

Analyses statistiques

Les statistiques ont été réalisées sur ordinateur avec les logiciels Statistica 5.5 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), SPAD 3.0 (Decisia, Paris, France) et StatXact 3.0 (Cytel Software Corporation, Cambridge, MA, USA). La plupart des tests choisis sont décrits dans le livre "Biostatistique" (Scherrer, 1984).

Afin de déterminer l'utilisation de tests paramétriques ou non paramétriques nous avons employé des tests de normalité. Les variables quantitatives à comparer ont donc fait l'objet de tests préalables pour vérifier la normalité de leur distribution et l'homogénéité de leurs variances. Les tests utilisés pour vérifier la normalité sont: le test de Kolmogorov-Smirnov (simples ou avec la probabilité de Lilliefors) et le test W de Shapiro-Wilk qui est plus sensible. Pour évaluer l'homogénéité des variances des paramètres comparés, on utilise les test de F Levène (Statistique F) et/ou de Bartlett (Statistique du χ^2).

Si les conditions de normalité ne sont pas respectées, nous utilisons un test non paramétrique. Nous avons utilisé le test U de Mann-Whitney pour comparer deux échantillons non appariés. Ce test cherche à vérifier si les éléments de deux groupes classés par ordre croissant sur une même échelle ordinale, occupe des rangs équivalents. Cependant, comme ce test ne prend pas en compte les comparaisons multiples, nous avons effectué la correction séquentielle de Bonferroni (Durand, 1998). Il s'agit de prendre en compte les comparaisons multiples en abaissant le taux de significativité du test en fonction du nombre de comparaisons effectuées et de corriger ce seuil de proche en proche. Ainsi, il faut classer les taux de significativité par ordre décroissant et comparer ces taux à la valeur corrigée suivant la règle: $\text{taux de significativité voulu} / \text{nombre de groupes à comparer}$. Seuls les taux de significativité inférieurs au taux corrigé sont déclarés "significativement différents".

Lorsque les comparaisons statistiques portent sur un nombre restreint d'individus (inférieur à 20) répartis en deux groupes indépendants nous avons utilisé un test de permutation (non paramétrique) mettant en œuvre des méthodes exactes de calculs. Le principe de base de ce test est le même que celui du test U de Mann-Whitney sauf qu'il ne procède pas à un codage en rang des données permettant un calcul "exact" des probabilités. Les données des deux groupes sont mélangées ensemble, puis l'ordinateur répartit les données

en 2 groupes de toutes les manières possibles. Tous les protocoles sont alors testés de façon à définir le seuil observé c'est-à-dire la proportion des cas où on a une différence des 2 moyennes supérieure ou égale à la différence observée. Si le seuil observé bilatéral ordinal est inférieur au taux de significativité (0,05) alors la différence des moyennes des deux groupes est déclarée comme étant "significative". Dans les cas où le nombre de protocoles possibles est trop important ($>50\,000$), au lieu de les tester tous, il est conseillé d'utiliser la procédure de Monte Carlo. Cette procédure va sélectionner un échantillon au hasard, représentatif de l'ensemble des protocoles, qui sera testé.

Pour savoir s'il existe une corrélation entre deux variables nous avons utilisé le test de Spearman. Il calcule un seuil de significativité à partir du coefficient de Spearman (R_s) et du nombre d'individus pris en compte.

CHAPITRE I

Chapitre I: Description et différenciation de trois espèces proches du genre *Pachycondyla*

Résumé de l'article 1

Une approche multidisciplinaire apporte de nouvelles preuves concernant la différenciation de trois taxa auparavant confondus en une seule espèce, *Pachycondyla villosa*. Tous les spécimens observés ont été collectés dans la même localité, à Ilhéus, Bahia, Brésil. La projection de la hauteur du pétiole contre la longueur du pétiole ainsi que le profil isozymique démontrent très clairement l'existence de trois taxa séparés. Chaque taxon est caractérisé par la longueur de chaîne et la structure chimique de ses hydrocarbures cuticulaires. Ces preuves convergentes démontrent qu'il existe bien trois différentes espèces valides. Des hypothèses écologiques sont émises afin de tenter d'expliquer l'intérêt de ces espèces à rester sympatriques.

A multidisciplinary approach to discriminating different taxa in the species complex *Pachycondyla villosa* (Formicidae)

CHRISTOPHE LUCAS^{1*}, DOMINIQUE FRESNEAU², KERSTIN KOLMER³, JURGEN HEINZE³, JACQUES H. C. DELABIE⁴ and DANG B. PHO¹

¹*Mécanismes de communication, Université Paris Sud, CNRS-UMR 8620, 91405 Orsay Cedex, France*

²*LEEC, Université Paris Nord, CNRS-UPRESA no. 7025, F-93430 Villetaneuse, France*

³*Biologie I, Universität Regensburg, D-93040 Regensburg, Germany*

⁴*Mirmecologia, Convênio UESC/CEPLAC, C.P. 7, 45600-000, Itabuna, Bahia, Brazil*

Received 23 May 2001; accepted for publication 12 October 2001

A multidisciplinary approach provides new evidence that strongly supports the differentiation of three taxa previously confounded in a single species, *Pachycondyla villosa*. All specimens studied were collected in the same location at Ilhéus, Bahia, Brazil. Bivariate plots of petiole heights vs. petiole lengths and isozyme patterns clearly differentiate the three taxa. Chain lengths and chemical structures of cuticular hydrocarbons are characteristic of each taxon. This congruent evidence shows that there are three different valid species. Ecological hypotheses are discussed to explain the benefits of these species remaining sympatric. © 2002 The Linnean Society of London, *Biological Journal of the Linnean Society*, 2002, **75**, 249–259.

ADDITIONAL KEYWORDS: ants – cuticular hydrocarbons – isozymes – morphometry – *Pachycondyla inversa* – *Pachycondyla subversa* – *Pachycondyla villosa* – Ponerinae – sympatry – taxonomy.

INTRODUCTION

Phenotypic variation among sympatric insects may confound the correct identification of some species and further characterization is therefore needed. This is true for the ponerine ant, *Pachycondyla villosa*, described by Fabricius in 1804. *P. villosa* is one of the most common ants of the genus in the Neotropical Region. In recent years, *P. villosa* has been intensively studied in a number of biological fields including: histology and morphology (Camargo-Mathias & Caetano, 1991; Camargo-Mathias *et al.*, 1991; 1992b; 1992b; 1992b; Camargo-Mathias & Caetano, 1992a, 1992b; 1995a; 1995b; 1996; Mariano *et al.*, 2000); regulation of reproduction (Heinze *et al.*, 1996; Trunzer *et al.*, 1998); foraging behaviour (Lachaud *et al.*, 1984; Hölldobler, 1985; Lachaud & Fresneau, 1985; Dejean & Corbara, 1990a, 1990b; Dejean *et al.*, 1990;

Valenzuela-Gonzalez *et al.*, 1994; Dejean & Corbara, 1998); and ecology (Pérez-Bautista *et al.*, 1985; Dejean, 1990).

Discrepancies in behaviour and ecology between the mentioned studies, suggest some heterogeneity. For example, in Yucatan, Mexico, where *P. villosa* invariably lives with epiphytes, Dejean (1990) observed a strong tendency of young queens to nest in Bromelia epiphytes of the genus *Aechmea*. A number of other papers refer to a similar mode of nesting (Dejean & Corbara, 1990a, 1990b; Dejean *et al.*, 1990; Camargo-Mathias & Caetano, 1991; 1992a; 1992b; 1995a; 1995b; 1996). Conversely, other studies refer to hollow branches of living or dead trees, abandoned preexisting nests, or rotten cocoa pods as the most characteristic nesting places (Lachaud *et al.*, 1984; Hölldobler, 1985; Pérez-Bautista *et al.*, 1985; Valenzuela-Gonzalez *et al.*, 1994; Heinze *et al.*, 1996; Trunzer *et al.*, 1998).

During our current study on colonies identified as *P. villosa*, consistent morphological differences were ob-

*Corresponding author.

E-mail: christophe.lucas@ibaic.u-psud.fr

served. This led us to refer to the taxon *Ponera inversa*, that was originally described by Smith in 1858, but was later related to *Pachycondyla villosa* as a subspecies by Forel (1899), Emery (1904, 1911), Kempf (1972) and Bolton (1995). According to Kempf (1972) and Bolton (1995), it is the only valid subspecies of this taxon and has approximately the same geographical range as *Pachycondyla villosa*, i.e. from Texas (Forel, 1899) to Argentina via Mexico (Kempf, 1972).

Biological, as well as taxonomic, data provided by the literature seem to have been intermingled, this suggests that some distinction must be made within the species complex *P. villosa*.

The available species keys are based mainly on morphology and a limited number of specimens. Recent technical developments in chemical analysis allow to distinguish between species using epicuticular hydrocarbon compositions (Lockey, 1991; Howard, 1993; El Messoussi *et al.*, 1994). In this study, one individual is sufficient to distinguish species. For example, several taxonomic studies were published on termites (Haverty *et al.*, 1988; Bagnères *et al.*, 1990; Haverty *et al.*, 2000), fruit flies (Bartelt *et al.*, 1986; Jallon & David, 1987; Lemeunier *et al.*, 1997), tsetse flies (Nelson *et al.*, 1988), and ants (Brill *et al.*, 1985; Yamaoka, 1990). Furthermore, isozyme electrophoresis and other biochemical techniques have also been used to successfully define taxa in species groups (Ward, 1980; Halliday, 1981; Douwes & Stille, 1987).

In this study, we report here new morphometric, biochemical and chemical data which allow better characterization and differentiation of three taxa, certainly three valid species, within populations recently considered a single species, *P. villosa*.

MATERIAL AND METHODS

ANTS

Queen-right colonies were collected from sympatric populations in the experimental fields of the Cocoa Research Center at Ilhéus, Bahia, Brazil. All colonies were reared in the laboratory in artificial nests for at least 6 months before analysis. The nests were maintained at $27 \pm 1^\circ\text{C}$, with approximately 60–80% relative humidity, and a 12L:12D photoperiod. All colonies were provided with an identical diet (honey/apple mixture, *Calliphora* sp. larvae, cockroaches and crickets) twice a week.

STATISTICAL ANALYSIS

Bivariate plots of morphometric measurements were performed by Statistica 5.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). To compare biometric data, we used a non-parametric test (Mann–Whitney *U*-test) with

the sequential Bonferroni correction of the *P*-values. Principal component analysis (PCA) was performed, on normalized variables for a better comparison, with SPAD 3.0 software (Cisia-Ceresta, Cedex, France).

SAMPLE PREPARATION FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Three colonies per species were studied. From each colony, three were taken and killed by freezing, cleaned in an ultrasonic-wave bath, and dehydrated using increasing concentrations of ethanol. The individuals were air-dried and then placed on aluminium stubs. They were coated with a mixture of 80% gold / 20% palladium and examined with a Leica Stereoscan 440 scanning electron microscope (Cedex, France) at 10 kV.

BIOMETRIC STUDY

A total of 86 workers taken from nine colonies (three for each species) were measured with an ocular micrometer on a Leica MZFL3 binocular microscope. The seven recorded measurements were taken where the studied part was the largest: length of the right scape (SL, magnification $\times 32$); dorsal width of head, including eyes (HW, magnification $\times 32$); dorsal petiolar width (PW, magnification $\times 63$); petiolar length (PL, magnification $\times 63$) in lateral view from the lateral flanges of the anterior peduncle to the posterior margin of the petiole (Ward, 1985); diagonal length of thorax (TL, magnification $\times 20$) in lateral view; dorsal width of thorax (TW, magnification $\times 50$); and finally height of the anterior face of petiole in lateral view (PHaf, magnification $\times 63$) from the anterior margin of petiole to the maximum height of the node (Fig. 1).

EXTRACTION PROCEDURE AND CHARACTERIZATION OF CUTICULAR HYDROCARBONS

Five to 10 workers per colony were selected from nine colonies (three for each species) with clean forceps, placed individually into chilled vials and killed by freezing at -20°C . Cuticular hydrocarbons were extracted from each whole individual by immersion for 5 min in 200 μL of hexane with three-dimensional agitation. The samples were dried under nitrogen and dissolved in 50 μL of hexane.

Each individual sample was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) carried out with a Fisons mass spectrometer MD 800 (electron impact at 70 eV) coupled directly with a Carlo Erba gas chromatograph GC 8065MS (Thermo-Finnigan, Cedex, France). The GC-MS was fitted with a 25QC2 BP1 methylsilicone capillary column (25 m \times 0.22 mm, ID \times 0.1 μm). 5 μL of sample. The oven temperature

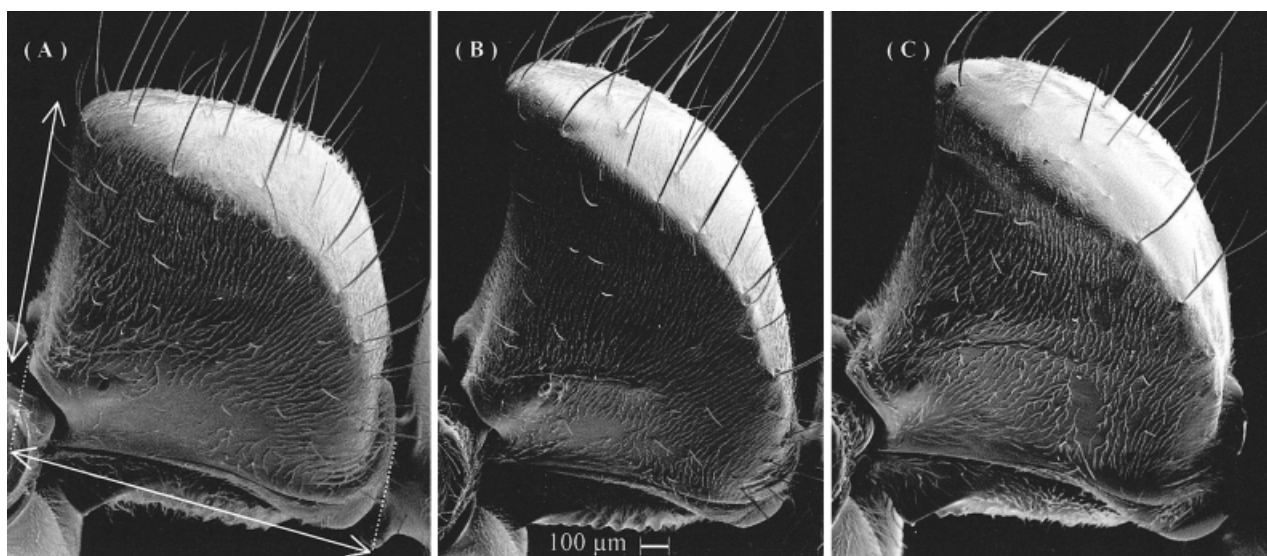


Figure 1. Scanning electron microscopy photographs of the left side of workers' petioles of Pvv (A), Pvi1 (B) and Pvi2 (C). Magnification $\times 152$. Vertical white arrow: PHaf, horizontal white arrow: PL.

was increased 1 min after injection from 60 to 225°C at 20°C min⁻¹ and from 225 to 325°C at 3°C min⁻¹ (isotherm 10 min). Data were integrated using an IBM-PC with MassLab 1.27, data acquisition, plotting and analysis software. Masses were scanned between 40 and 700 amu at 0.45 scan s⁻¹. The mass spectra of alkanes were interpreted according to the criteria proposed by McCarthy *et al.* (1968), Nelson *et al.* (1972), Nelson (1978), and Pomonis *et al.* (1978, 1980).

ISOZYME ELECTROPHORESIS

Head, thorax and gaster of individual workers were ground separately in 50 µL of distilled water. The homogenate (6–14 µL) was subsequently applied onto presoaked cellulose acetate plates. Protein separation was carried out in one of three buffer systems (0.1 M Tris-citrate pH 8.2, Tris-maleate-EDTA pH 7.4 and pH 8.3) with 1–7 mA per gel for 5–35 min, depending on the enzyme system. Using slightly modified protocols from Murphy *et al.* (1990), 29 enzymes were stained, six of which appeared to be of diagnostic value: alkaline phosphatase (ALP), esterases (EST), glucose-6-phosphate isomerase (GPI), isocitrate dehydrogenase (IDH), trehalase (TRE) and xanthine dehydrogenase (XDH). One to six workers were investigated in each of the 58 colonies except for ALP (five colonies) and XDH (15 colonies).

RESULTS

All results allow us to distinguish three taxa in the species complex *Pachycondyla villosa*: the *Pachy-*

condyla villosa villosa (Pvv), the taxa provisionally called *Pachycondyla villosa inversa* phenotype 1 (Pvi1), and *Pachycondyla villosa inversa* phenotype 2 (Pvi2).

MORPHOLOGY

Workers in the species complex *P. villosa* are morphologically very similar, with a dark colouration except for mandibles, legs and other ventral parts of the ants. A dark reddish colouration is most frequently observed among individuals of Pvv and also in a few cases of Pvi2, where the red is less intense. Taxa may be differentiated more precisely by the morphology of the petiole. In lateral view, the petiole of Pvv is globally as long as it is high, its anterior face is straight or weakly concave and forms a right angle (sometimes a little rounded) with the dorsal face (Fig. 1A). In Pvi1, the petiole is higher than its length, the anterior face is highly concave (Smith, 1858) and forms an acute angle ($\pm 60^\circ$) with the dorsal face (Fig. 1B). For Pvi2, it is as high as, or slightly higher than its length, the anterior face is concave and forms a weak acute angle with the dorsal face (Fig. 1C). This lack of clearly defined morphological and colour differences, especially between Pvv and Pvi2, may have been responsible for the current confusion regarding the taxonomy of the species complex *Pachycondyla villosa*. This confusion highlights the requirement of quantitative data in order to obtain a definitive characterization of each taxon.

BIOMETRY

All measures (Fig. 2) were statistically significantly different ($P < 0.05$) between any two taxa with two exceptions: TL and PL were not significantly different between Pvv and Pvi2. All other measurements, except PHaf, were larger for Pvv. As for Pvi1, all measures were significantly the smallest with two exceptions: PW is the smallest in Pvi2 and PHaf in Pvv.

Bivariate plots of morphometric measurements revealed that only the plot of PHaf vs. PL clearly differentiated the three taxa (Fig. 3).

CHEMICAL DATA

The analysis of cuticular hydrocarbons was very useful for the final distinction between Pvv, Pvi1 and Pvi2. Their hydrocarbons (HCs) have even- or odd-numbered chain lengths, are saturated or unsaturated, linear or branched with branching occurring indifferently on even- or odd-numbered carbon atoms. Internal monomethylalkanes (starting from 7-methyl) appear as mixtures of unresolved isomers among which the 11- to 13- isomers are dominant. Both types make up homologous series in each species. Dimethylalkanes are also observed as mixtures, but there is more diversity in branchings. Unsaturated HCs are linear or internally methylbranched monoenes separated from the corresponding alkanes by approximately -0.3 equivalent chain length (ECL). *n*-alkenes are easily identifiable, whereas the mass spectra of methylalkenes are more complex with clusters of diagnostic fragments 1–3 amu lower than the corresponding doublets of methylalkanes, as well as additional clusters resulting from β -cleavage at the branching points. Furthermore, with the presence of isomers under the same peak, the interpretation of the spectra may be more complex. Nevertheless, their general pat-

terns and molecular masses are suggestive of the same methyl branching, as it has been found in the immediate following saturated methylalkanes. A more precise structural determination, as well as double bond location, would need their isolation and chemical modification, they are therefore included as Xi-MeCn:1 in Table 1.

The range of the prevalent HCs' chain lengths (mean percentage >2) differs from one subspecies to another: 25–27 C for Pvi2, 27–30 C for Pvi1 and 29–41 C for Pvv. Indeed, only 3-MeC29 (peak 53) is common to Pvv and Pvi1. The chromatographic profile of each taxon is therefore characteristic (Fig. 4).

Table 1 gathers the percentages of the individual HCs present in any of the three subspecies. In Pvi2, *n*-C25 and a series of monomethyl- and dimethylpentacosanes represent 90% of the total HCs. The bulk of monomethylalkanes are end-branched whereas the dimethylalkanes comprise almost exclusively one series of isomers with one external and one internal branch. If we also consider the minor components, the same scheme is discernible for different chain lengths. A trimethylalkane (5,13,17-triMeC25) is present in small quantities only in this subspecies, whereas no unsaturated HCs are observed.

In Pvi1, apart from the preponderance of *n*-alkanes and monomethylalkanes (3- and internally branched), two features are to be noted: the presence in small abundance of dimethylalkanes (2.67%), and the significant percentage of some isomeric internal monomethylalkanes (10.11%), particularly methyl-nonacosenes (6.44%).

In Pvv, cuticular HCs occurred in two distinct groups: early eluting external monomethylalkanes (42, 52, 53, 58 and 63) representing 15.37% and late eluting compounds amounting to 81.29% (Fig. 4). This latter group may be divided into two characteristic

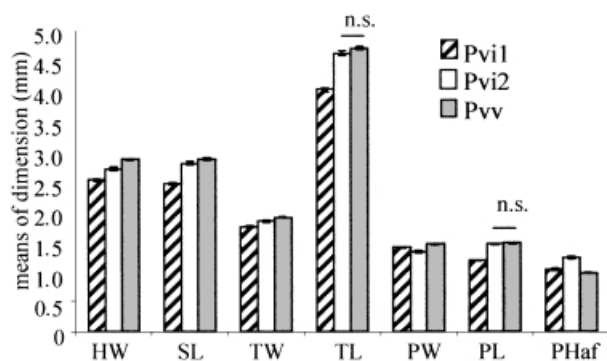


Figure 2. Mean (\pm SD) of the biometric measurements of Pvi1, Pvi2 and Pvv ($n = 26, 30$ and 30 , respectively). There are significant differences ($P < 0.05$) between measures of each group except for the two groups marked ns.

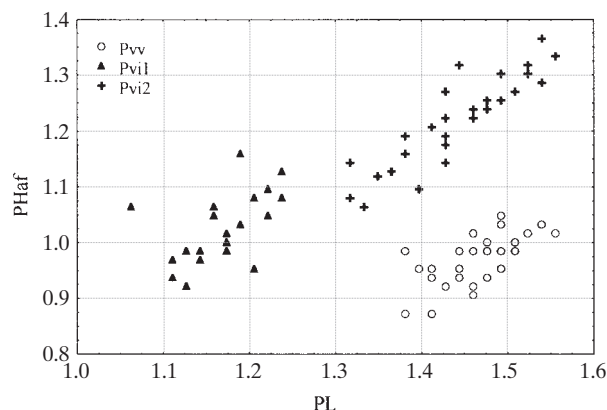


Figure 3. Bivariate plots of PHaf by PL measurements (mm) of Pvv, Pvi1 and Pvi2.

Table 1. Percentages of cuticular hydrocarbons of workers of Pvv, Pvi1 and Pvi2 in order of increasing retention times. Mean values \pm SD, $n = 22, 24$ and 19 , respectively; **bold type** $> 2\%$; trace (tr) $< 0.1\%$

Peak	Compound	Pvv	Pvi1	Pvi2	Peak	Compound	Pvv	Pvi1	Pvi2
1	nC23	0	0	tr	42	4-,2-MeC28	2.23 (0.35)	1.25 (0.16)	0
2	11-,9-,7-MeC23	0	0	tr	43	3-MeC28	0	0.41 (0.04)	0
3	5-MeC23	0	0	tr	44	nC29 : 1	0	0.87 (0.22)	0
4	3-MeC23	0	0	tr	45	nC29	1.65 (0.31)	8.61 (1.41)	0.10 (0.02)
5	5,15-; 5,17-; 7,15-diMeC23	0	0	tr	46	Xi-MeC29 : 1	0	6.44 (1.38)	0
6	nC24	0	0	0.17 (0.04)	47	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	0.29 (0.07)	14.45 (1.53)	0.42 (0.17)
7	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24	0	0	tr	48	5-MeC29	0	tr	tr
8	6-,5-MeC24	0	0	tr	49	diMeC29 : 1	0	0.61 (0.29)	0
9	4-,2-MeC24	0	0	tr	50	9,13-; 11,15-diMeC29	0	1.14 (0.31)	0
10	3-MeC24	0	0	0.13 (0.07)	51	5,17-diMeC29	0	0	0.17 (0.14)
11	nC25	0	0.32 (0.05)	16.48 (1.97)	52	2-MeC29	tr	0	0
12	13-,11-,9-MeC25	0	tr	5.88 (0.60)	53	3-MeC29	7.73 (0.79)	5.80 (0.67)	tr
13	7-MeC25	0	tr	3.48 (0.29)	54	nC30	0.74 (0.12)	tr	0
14	5-MeC25	0	0	11.05 (0.56)	55	3,X-diMeC29	0	0.20 (0.05)	0
15	3-MeC25	0	tr	21.49 (1.38)	56	Xi-MeC30 : 1	0	tr	0
16	5,19-; 5,17-; 5,15-; 5,13-diMeC25	0	0	31.65 (1.84)	57	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	0	0.31 (0.06)	0
17	nC26	0	0.54 (0.09)	0.92 (0.34)	58	2-MeC30	3.99 (0.48)	0	0
18	3,17-; 3,15-; 3,13-diMeC25	0	0	1.27 (0.16)	59	nC31	0.36 (0.07)	0	0
19	5,13,17-triMeC25	0	0	0.41 (0.08)	60	Xi-MeC31 : 1	0	0.43 (0.13)	0
20	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	0	0.18 (0.05)	0.42 (0.06)	61	15-,13-,11-MeC31	0.17 (0.05)	0.86 (0.11)	0
21	6-,5-MeC26	0	tr	0.22 (0.03)	62	11,15-diMeC31	0	tr	0
22	4-,2-MeC26	0	0.35 (0.09)	tr	63	3-MeC31	1.40 (0.19)	0	0
23	3-MeC26	0	0.15 (0.05)	tr	64	11-,13-MeC33	tr	0	0
24	6,18-; 6,14-; 5,17-diMeC26	0	0	0.21 (0.02)	65	13,17-diMeC33	tr	0	0
25	4,18-; 4,16-; 4,14-diMeC26	0	0	tr	66	Xi-MeC35 : 1	0.17 (0.05)	0	0
26	nC27 : 1	0	0.97 (0.20)	0	67	17-,15-,13-MeC35	0.52 (0.11)	0	0
27	nC27	0	21.87 (1.56)	1.31 (0.29)	68	diMeC35 : 1	tr	0	0
28	Xi-MeC27 : 1	0	0.44 (0.12)	0	69	13,19-; 13,17-diMeC35	6.42 (0.64)	0	0
29	3,13-; 3,15-diMeC26	0	0	tr	70	13,23-diMeC35	0	0	0.13 (0.05)
30	13-,11-,9-,7-MeC27	0	13.78 (2.35)	1.20 (0.14)	71	14,18-; 12,16-diMeC36	0.59 (0.12)	0	0
31	5-MeC27	0	tr	0.40 (0.18)	72	Xi-MeC37 : 1	1.18 (0.33)	0	0
32	9,13-; 11,15-diMeC27	0	0.33 (0.09)	0	73	19-,17-,15-,13-MeC37	5.42 (0.30)	0	0
33	5,19-; 5,17-; 5,15-; 5,13-diMeC27	0	0.13 (0.05)	1.13 (0.24)	74	15,19-; 13,17-diMeC37	54.69 (3.37)	0	0
34	3-MeC27	0	13.58 (1.41)	1.03 (0.27)	75	13,25-; 15,23-diMeC37	0	0	0.12 (0.04)
35	nC28 : 1	0	0.11 (0.03)	0	76	14,18-; 13,17-diMeC38	0.44 (0.12)	0	0
36	nC28	tr	3.12 (0.30)	tr	77	Xi-MeC39 : 1	0.90 (0.30)	0	0
37	3,11-; 3,9-; 3,7-diMeC27	0	0.85 (0.18)	0	78	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	3.03 (0.42)	0	0
38	3,19-; 3,17-; 3,15-diMeC27	0	0	tr	79	13,19-diMeC39	7.47 (0.76)	0	0
39	Xi-MeC28 : 1	0	0.14 (0.04)	0	80	21-,19-,15-,13-MeC41	0.13 (0.06)	0	0
40	14-,13-,12-,11-,10-MeC28	0	1.58 (0.12)	0	81	15,21-; 13,19-diMeC41	0.20 (0.09)	0	0
41	6-MeC28	0	0.12 (0.02)	0	82	13-,19-diMeC43	tr	0	0

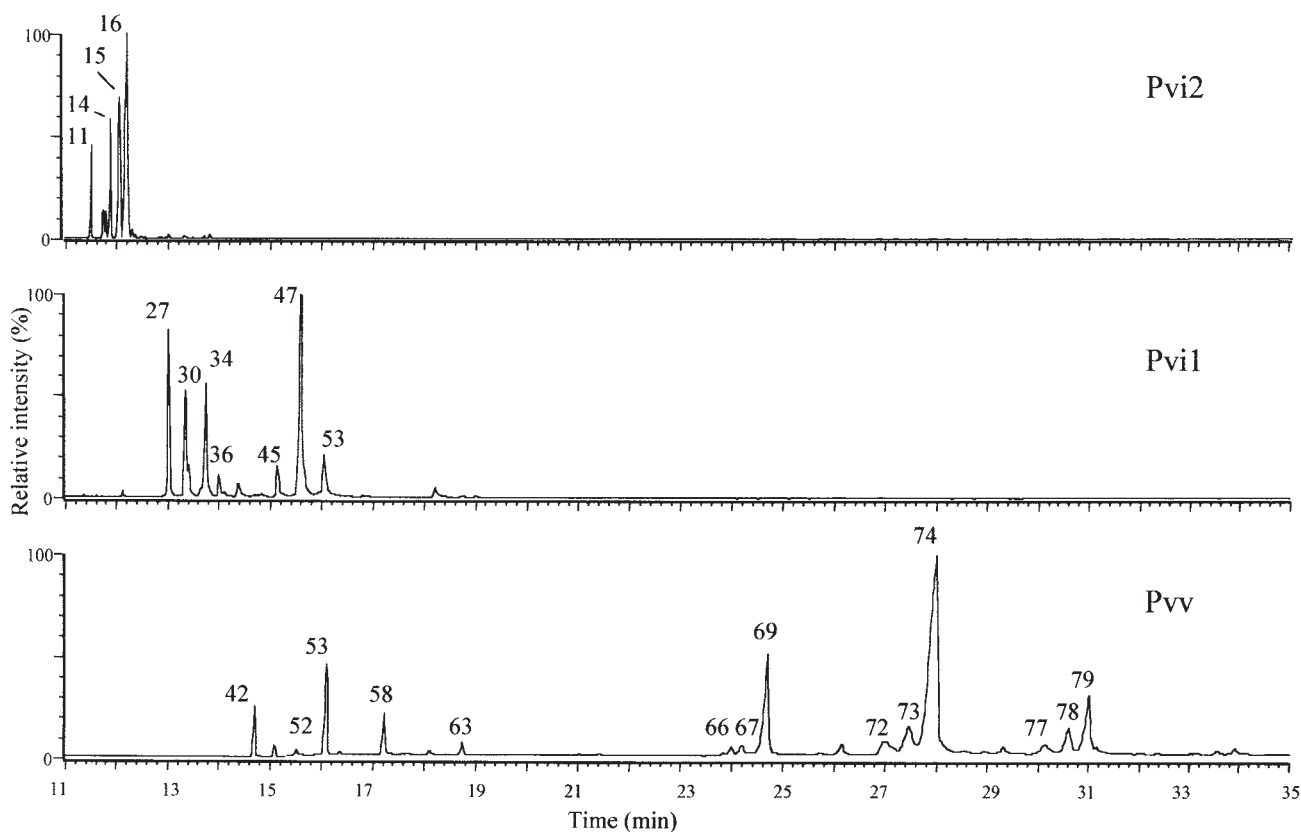


Figure 4. Total ion chromatograms of the HCs from Pvv, Pvi1 and Pvi2. Numbers refer to the peaks listed in Table 1.

subgroups, each of which associating a Xi-methylalkene (66, 72 and 77), a 13-methylalkane (67, 73 and 78) and a 13,17- and/or 13,19-dimethylalkane (69, 74 and 79), in order of increasing abundance (2.25, 8.97 and 68.58%, respectively). On the whole, beside monomethylalkanes (25%), the most important compounds in Pvv are dimethylalkanes (70%) with two internal branches, whereas those of Pvi2 (35.36%) have both external and internal branches. On the contrary, *n*-alkanes and methylalkenes are only minor ones.

The PCA of the percentages of the cuticular HCs supports the distinction between the three taxa (Fig. 5). The variables were normalized during the analysis in order to obtain a better comparison. The first two factors, F1 and F2, represent, respectively, 29 and 23% of the total variance. This analysis involving 82 compounds, the cumulative percentage of these two factors (52%), is a good index of reliability. The plot of the coordinates of all the individuals against the F1 and F2 axes shows three clearly separated and rather elongated clusters, each of which corresponding to only one subspecies. Pvi2 is positively correlated to axis 1, whereas Pvv and Pvi1 are negatively correlated

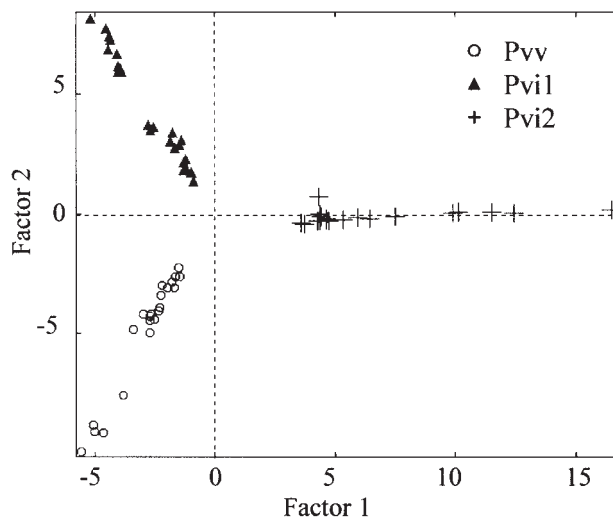


Figure 5. PCA of HC percentages of Pvv, Pvi1 and Pvi2. The first two factors F1 and F2 represent, respectively, 29 and 23% of the total variance.

Table 2. Electromorph patterns of six enzymes in the species complex *P. villosa*. Migration velocity of different electromorphs in the gel is indicated by f (fast), m (medium), and s (slow). Buffer 1: 0.1M Tris-citrate pH 8.2; buffer 2: Tris-maleate-EDTA pH 7.4; buffer 3: Tris-maleate-EDTA pH 8.3, current: 3–6 mA, voltage: 180–230 V.

Enzyme	Pvv	Pvi1	Pvi2	No. of colonies	Buffer	Time (min)	No. of applications
ALP	<i>mm</i>	<i>ff</i>	<i>ss</i>	5	1	10–20	4
EST	<i>ss</i>	<i>ff</i>	<i>mm</i>	58	1,2,3	30–35	3–4
GPI	<i>ff</i>	<i>mm</i>	<i>ss</i>	58	1	30	1
IDH	<i>mm</i>	<i>ff</i>	<i>ss</i>	58	2	25	5
TRE	<i>mm</i>	<i>ss</i>	–	58	1	20	3–5
XDH	<i>ss</i>	<i>mm</i>	<i>mm</i>	15	1	20	5

to this axis. Conversely, the correlation to axis 2 is positive for Pvi1 and negative for Pvv.

ISOZYME ELECTROPHORESIS

Twenty of a total 29 examined enzyme systems could be reliably stained. The banding patterns of five enzymes (ALP, EST, GPI, IDH, and TRE) showed clear differences between the taxa, and heterozygote individuals were never found (Table 2). It appears that the three taxa are fixed for different electromorphs at these five diagnostic loci. Another enzyme, XDH, differed consistently between Pvv and Pvi1/2, but had identical electromorphs in Pvi1 and Pvi2.

Any intraspecific variation at the respective loci was not found. Banding patterns of four additional enzymes (malate dehydrogenase, phosphate-dependent malate dehydrogenase, phosphoglucumutase, phosphoglucuronate dehydrogenase) could not be sufficiently resolved using cellulose acetate plates, but we propose that they might also differ between species.

DISCUSSION

Discrepancies regarding the identification of *P. villosa* in recent studies, and consequently in results obtained, e.g. the number of ovarioles (Camargo-Mathias & Caetano, 1992b), have led us to look at further means of characterization. It soon became obvious that morphological data provided by electron scanning microscopy, biometric measurements and statistical analysis allowed the distinction of three clearly different taxa. Nevertheless, additional and less tedious techniques were desirable and both enzyme electrophoresis and cuticular HCs analysis are commendable ones.

Cuticular HCs play a number of roles in insects, from water-proofing, thermal insulation, protection from predators, to chemical communication, reproduction isolation, and kin and species recognition. They are stable end-products of biosynthetic pathways

endogenous to insects (Blomquist & Dillwith, 1985; Chang Yong & Jallon, 1986), thus reflecting their genotypes and are expected to be species-specific (Lockey, 1991; Howard, 1993). Cuticular HCs have been shown to be largely genetically determined (Ferveur, 1991; Kaib *et al.*, 1991; Page *et al.*, 1991; Coyne *et al.*, 1994; Ferveur & Jallon, 1996; Coyne *et al.*, 1999).

A growing body of experimental evidence suggests that insect HC compositions are species-, colony- and caste-specific (Singer, 1998). Taxonomic studies, however, of insects based on chemical analysis are often confronted with similar qualitative profiles with only quantitative differences (Lockey, 1991; El Mesoussi *et al.*, 1994), some of which may be attributed to non-specific factors such as age, diet, habitat and other environmental factors (Toolson, 1982; Vander Meer *et al.*, 1989; Dahbi *et al.*, 1996). In this study, chromatographic profiles reveal important differences in chain lengths and types of components (linear, unsaturated, monomethyl- or dimethyl-, end- or internally branched). We have chosen sympatric colonies reared under identical conditions, ruling out the possibility that differences in cuticular composition might result from differences in diet or other environmental effects.

As the species specificity of these HCs has been demonstrated, the next step, naturally, is to determine which of the various potential roles cited in the literature is played in the three species we have studied. One of the most well known roles is the regulation of cuticular permeability. Gibbs & Pomonis (1995) and Gibbs (1998a) have shown that the structures of HCs clearly affect the melting point (T_m) of HC model mixtures or arthropod's cuticles (Gibbs, 1998b). Grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) exhibit geographical variation of their cuticular HC compositions with latitude, their T_m being higher with warmer temperature (Gibbs & Mousseau, 1994). Studies on the cockroach *Blattella germanica* (Young *et al.*, 2000) have shown that the HCs predicted to have T_m increasing effects are more abundant in

tissues that require greater waterproofing as the oothecal exterior or the epicuticle. It will be interesting to study the correlation, if any, between cuticular HC compositions and nesting habits of the three *Pachycondyla* species.

Numerous studies have also evidenced the role of cuticular HCs in chemical communication and nestmate recognition (Singer, 1998). Solitary insects of various genera identify their potential mates using species- and sex-specific HCs. Social insects also need HC signals to recognize their nestmates from non-nestmates in order to preserve their resources and maintain their social structure. Whole cuticular lipid extracts have been shown to elicit aggressive reactions between non-nestmate workers in such ant species as *Camponotus vagus* (Bonavita-Cougourdan *et al.*, 1987) and *Cataglyphis cursor* (Nowbahari *et al.*, 1990). More recently, HC fractions of the extract have been tested and their role in nestmate recognition confirmed for *Iridomyrmex purpureus* (Thomas *et al.*, 1999), *Cataglyphis niger* (Lahav *et al.*, 1999) and *Pogonomyrmex barbatus* (Wagner *et al.*, 2000). We have already set up a new ethological test allowing the determination of characteristic behavioural items when two species are present. Work is under way to assess the role of cuticular extracts and HCs in interactions between the three species.

Another issue must be raised regarding *Pachycondyla* HCs. A recent publication (Hefetz *et al.*, 2001) has shown that in *Pachycondyla apicalis* workers, long chain alkadienes, particularly 5,9-C27:2, are clearly dominant in cuticular and postpharyngeal gland HC profiles, whereas methyl-branched alkanes are present only in trace amounts. The authors have raised the question as to whether the presence of alkadienes as major constituents is specific for the *Pachycondyla* genus. Our data show no detectable alkadiene in the three species studied and comply with most of the results on ants' chemistry published up until now. In *Harpegnathos saltator*, Liebig *et al.* (2000) have found C35:2 and C37:2 in dispersing and callow queens, but these dienes are almost absent in outside workers. More data on various ant species in general and particularly on *Pachycondyla* species are needed before the species specificity of this class of cuticular HCs can be assessed.

Isozyme studies confirmed the results of chemical analysis. At least five diagnostic enzyme loci distinguish the three taxa and a sixth locus allows differentiation between Pvv on one side and Pvi1 and Pvi2 on the other. The absence of heterozygotes in the sympatric populations at Ilhéus suggests that the three taxa are reproductively isolated. This is supported by the preliminary observation that mating between Pvv/Pvv and Pvv/Pvi1 produced workers only in the first case.

Because of the ease of isozyme electrophoresis on cellulose acetate plates and the clarity of the results, this technique could be used in the future to determine whether gene flow is also restricted in other populations and to which taxon particular individuals belong. Preliminary data suggest that certain loci consistently differ between the *P. villosa* group and related species, such as *P. obscuricornis*.

Biometric studies also afford diagnostic elements, although intermediacies in morphology/biometry and in chromatographic profiles do not coincide. A hierarchical analysis (using Ward's method for clustering) based on biometric and chemical data links together Pvv/Pvi2 and Pvi1/Pvi2, respectively (data not shown).

The congruence between our data from biometric, genetic and chemical analyses clearly demonstrates that three subspecies or, more probably, three species, are to be distinguished in the species complex considered until now as *P. villosa*.

According to descriptions in the literature, Pvv appears to be *P. villosa* (see, e.g. Wheeler, 1908; Galardo, 1918). The taxonomic status of Pvi1 and Pvi2 is not completely clear. Pvi1 is presumably *P. inversa*, that can be considered to be a valid species as originally described by Smith (1858). Pvi2 is a new species that we provisionally call *Pachycondyla subversa*, until complete taxonomic description is performed.

Our study provides a new insight into *P. villosa* taxonomy and suggests that some of the data recently obtained may have to be reinvestigated as far as species identification is concerned. The present situation of the genus *Pachycondyla* remains very confuse as Brown (1973) has put in synonymy several genera under that name, including *Neoponera* that formerly included *P. villosa* (Kempf, 1972). Well accepted by most taxonomists (Kempf & Lenko, 1976; Bolton, 1995), this synonymy has never been clearly justified and the genus in its modern form needs, as the whole taxa under it, an exhaustive revision. Current investigations in progress aim to obtain more information regarding the status of the *P. villosa* species complex, including biogeographical, behavioural and karyological observations. Only after these have been completed, will it be possible to make a large and complete redescription of the species included in the complex. This situation is not an isolated case, as recent (unpublished) taxonomical, biological and ecological observations strongly suggest that several other Neotropical *Pachycondyla*, until now considered as good species, would be actually species complexes as in the case presented here. Chemistry and genetics have also proven to be crucial for the taxonomy of other insects as evidenced, e.g. data obtained by Nelson *et al.* (2001) on termites.

An interesting issue is the maintenance of a '*villosa* morph' formed by these three species, that remain

similar in general morphology, and by at least two spider species, their Batesian mimics. These spiders belong to two distinct families: *Sphecotypus niger* (Clubionidae) and *Zuniga* sp. (Salticidae). The myrmecomorphy is not so rare in the Neotropics, ant models are generally found in dominant arboreal genera such as *Camponotus*, *Crematogaster*, *Dolichoderus*, *Ectatomma* and *Pseudomyrmex*. In the *Pachycondyla* genus, only the 'villosa morph' is an evident model for spiders (Delabie, 2000). One could hypothesize that the 'villosa morph' allows this group of species, individually weakly competitive and not dominant, to appear all together, omnipresent on trees, numerically abundant, and disuasive towards different larger predators, thus forming a potential Müllerian mimicry ring (McIver & Stonedahl, 1993).

Further studies should be carried out in order to understand better the structure and ecology of the 'villosa morph' not only in Ilhéus, but everywhere where its different taxa live together. As at least two of them are largely sympatric, according to the literature the phenomenon described herein may not be the product of a local situation, but is probably distributed throughout the Neotropical region.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J-M. Jallon for discussions and comments on the manuscript, J-L. Durand and J. Rouault for their helpful remarks on statistical analysis and M-C. Malherbe for her contribution in electron microscopy. We are grateful to C. Company for comments on the English translation. This research was supported by a CAPES COFECUB grant (944–188) and by a scientific expedition permit from the Brazilian Ministry of Science and Technology (028/00).

REFERENCES

- Bagnères AG, Clément JL, Blum MS, Severson RF, Joulie C, Lange C. 1990. Cuticular hydrocarbons and defensive compounds of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *R. santonensis* (Feytaud): polymorphism and chemotaxonomy. *Journal of Chemical Ecology* **16**: 3213–3244.
- Bartelt RJ, Arnold MT, Schaner AM, Jackson LL. 1986. Comparative analysis of cuticular hydrocarbons in the *Drosophila virilis* species group. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry* **83**: 731–742.
- Blomquist GJ, Dillwith JW. 1985. Cuticular lipids. In: Kerkut GA, Gilbert LI, eds. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 1st edn. Oxford: Pergamon Press. 117–154.
- Bolton B. 1995. *A new general catalogue of the ants of the world*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Bonavita-Cougourdan A, Clément JL, Lange C. 1987. Nestmate recognition: the role of cuticular hydrocarbons in the ant *Camponotus vagus* Scop. *Journal of Entomological Science* **22**: 1–10.
- Brill JH, Mar T, Mayfield HT, Bertsch W. 1985. Use of computerized pattern recognition in the study of the cuticular hydrocarbons of imported fire ants. II. Comparison of the cuticular hydrocarbon patterns between different colonies of *Solenopsis richteri*. *Journal of Chromatography* **349**: 39–48.
- Brown WL Jr. 1973. A comparison of the Hylean and Congo-West African rain forest ant faunas. In: Meggers BJ, Ayensu ES, Duckworth WD, eds. *Tropical forest ecosystems in Africa and South America: a comparative review*. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 161–185.
- Camargo-Mathias MI, Caetano FH. 1991. Corpora allata and corpora cardiaca in female ants of the species *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae): morphology and histology. *Revista Brasileira de Biologia* **51**: 349–354.
- Camargo-Mathias MI, Caetano FH. 1992a. Inner female genitalia histology in the ant *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae). *Revista Brasileira de Biologia* **52**: 235–244.
- Camargo-Mathias MI, Caetano FH. 1992b. Ovarian morphology of the ants *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae). *Revista Brasileira de Biologia* **52**: 251–257.
- Camargo-Mathias MI, Caetano FH. 1995a. Corpora allata in females of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae)—relation with ovarian development. *Sociobiology* **26**: 283–289.
- Camargo-Mathias MI, Caetano FH. 1995b. Trophic eggs in workers of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Journal of Advanced Zoology* **16**: 62–66.
- Camargo-Mathias MI, Caetano FH. 1996. Histochemical and ultrastructural cytochemistry of glycogene in ovarioles of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Journal of Advanced Zoology* **17**: 64–67.
- Camargo-Mathias MI, Landim CC, Caetano FH. 1991. Ultrastructural aspects of the mandibular glands of *Neoponera villosa* workers (Hymenoptera: Ponerinae). *Journal of Advanced Zoology* **12**: 72–80.
- Chang Yong TP, Jallon J-M. 1986. Synthèse de novo d'hydrocarbures potentiellement aphrodisiaques chez les Drosophiles. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences* **303**: 197–202.
- Coyne JA, Crittenden AP, Katherine M. 1994. Genetics of a pheromonal difference contributing to reproductive isolation in *Drosophila*. *Science* **265**: 1461–1464.
- Coyne JA, Wicker-Thomas C, Jallon J-M. 1999. A gene responsible for a cuticular hydrocarbon polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research* **73**: 189–203.
- 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**: 2173–2186.
- Dejean A. 1990. Influence of the preimaginal and precocious environment on the choice of the nest in the ant *Pachycondyla villosa* (Fabr.). *Behavioural Processes* **21**: 107–125.

- Dejean A, Corbara B. 1990a.** L'alimentation sucrée des larves chez *Pachycondyla villosa* (Formicidae: Ponerinae). *Biology of Behavior* **15**: 117–124.
- Dejean A, Corbara B. 1990b.** Predatory behavior of a neotropical arboricolous ant: *Pachycondyla villosa* (Formicidae: Ponerinae). *Sociobiology* **17**: 271–286.
- Dejean A, Corbara B. 1998.** Study of different foraging paths of the predatory neotropical ponerine ant *Pachycondyla* (=Neoponera) *villosa* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology* **32**: 409–426.
- Dejean A, Corbara B, Oliva-Rivera J. 1990.** Mise en évidence d'une forme d'apprentissage dans le comportement de capture des proies chez *Pachycondyla* (=Neoponera) *villosa* (Formicidae: Ponerinae). *Behaviour* **115**: 175–187.
- Delabie JHC. 2000.** Aspectos da mirmecofagia na Região Neotropical. *Naturalia* **24** (n. esp): 225–231.
- Douwes P, Stille B. 1987.** The use of enzyme electrophoresis in Leptothorax classification. In: Eder J, Rembold H, eds. *Chemistry and biology of social insects*. München: Verlag J. Peperny, 29–30.
- El Messoussi S, Wicker C, Arienti M, Carlson DA, Jallon J-M. 1994.** Hydrocarbons in species recognition in insects. In: Hawksworth DL, ed. *The identification and characterization of pest organisms*. Wallingford: CAB International, 277–287.
- Emery C. 1904.** Zur Kenntniss des Polymorphismus der Ameisen. *Zoologische Jahrbücher Supplement* **7**: 587–610.
- Emery C. 1911.** Hymenoptera. Fam. Formicidae Subfam. Ponerinae. *Genera Insectorum* **118**: 1–125.
- Ferveur J-F. 1991.** Genetic control of pheromones in *Drosophila melanogaster*. I. Ngbo, a locus on the second chromosome. *Genetics* **128**: 293–301.
- Ferveur J-F, Jallon J-M. 1996.** Genetic control of male cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research* **67**: 211–218.
- Forel A. 1899.** Hymenoptera. III. Formicidae. *Biologia Centrali-Americana*, 169.
- Gallardo A. 1918.** Las hormigas de la República Argentina. Subfamilia Ponerinas. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires* **30**: 1–112.
- Gibbs AG. 1998a.** The role of lipid physical properties in lipid barriers. *American Zoologist* **38**: 268–279.
- Gibbs AG. 1998b.** Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist* **38**: 471–482.
- Gibbs AG, Mousseau TA. 1994.** Thermal acclimation and genetic variation in cuticular lipids of the lesser migratory grasshopper (*Melanoplus sanguinipes*): effects of lipid composition on biophysical properties. *Physiological Zoology* **67**: 1523–1543.
- Gibbs AG, Pomonis JG. 1995.** Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: the effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry* **112**: 243–249.
- Halliday RB. 1981.** Heterozygosity and genetic distance in sibling species of meat ants (*Iridomyrmex purpureus* group). *Evolution* **35**: 234–242.
- Haverty MI, Marion P, Nelson LJ, Blomquist GJ. 1988.** Cuticular hydrocarbons of dampwood termites, *Zootermopsis*: intra- and intercolony variation and potential as taxonomic characters. *Journal of Chemical Ecology* **14**: 1035–1057.
- Haverty MI, Woodrow RJ, Nelson LJ, Grace JK. 2000.** Cuticular hydrocarbons of the Hawaiian islands. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 1167–1191.
- Hefetz A, Soroker V, Dahbi A, Malherbe MC, Fresneau D. 2001.** The front basitarsal brush in *Pachycondyla apicalis* and its role in hydrocarbon circulation. *Chemoecology* **11**: 17–24.
- Heinze J, Trunzer B, Oliveira PS, Hölldobler B. 1996.** Regulation of reproduction in the neotropical ponerine ant, *Pachycondyla villosa*. *Journal of Insect Behavior* **9**: 441–450.
- Hölldobler B. 1985.** Liquid food transmission and antennation signals in ponerine ants. *Israel Journal of Entomology* **19**: 89–99.
- Howard RW. 1993.** Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: Stanley-Hammerson DW, Nelson DR, eds. *Insect lipids: chemistry, biodiversity and biology*. Nebraska: University of Nebraska Press, 179–226.
- Jallon J-M, David JR. 1987.** Variations in cuticular hydrocarbons among the eight species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Evolution* **41**: 294–302.
- Kaib M, Brandl R, Bagine RKN. 1991.** Cuticular hydrocarbon profiles: a valuable tool in termite taxonomy. *Naturwissenschaften* **78**: 176–179.
- Kempff WW. 1972.** Catálogo abreviado das formigas da região Neotropical. *Studia Entomologica* **15**: 3–344.
- Kempff WW, Lenko K. 1976.** Levantamento da formicifauna no litoral norte e ilhas adjacentes do Estado de São Paulo. Brasil. I. Subfamilias Dorylinae, Ponerinae e Pseudomyrmecinae (Hym., Formicidae). *Studia Entomologica* **19**: 45–66.
- Lachaud J-P, Fresneau D. 1985.** Les premières étapes de l'ontogénèse de la société chez *Ectatomma tuberculatum* et *Neoponera villosa* (Hym., Form., Ponerinae). *Actes des Colloques Insectes Sociaux* **2**: 195–202.
- Lachaud J-P, Fresneau D, García-Pérez J. 1984.** Etude des stratégies d'approvisionnement chez trois espèces de fourmis Ponerines (Hymenoptera: Formicidae). *Folia Entomologica Mexicana* **61**: 159–177.
- Lahav S, Soroker V, Hefetz A, Vander Meer RK. 1999.** Direct behavioural evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* **86**: 246–249.
- Lemeunier F, Aulard S, Arienti M, Jallon J-M, Cariou ML, Tsacas L. 1997.** The Erepepe Complex: new cases of insular speciation within *Drosophila ananassae* species subgroup (*melanogaster* group) and descriptions of two new species (Diptera: Drosophilidae). *Annals of the Entomological Society of America* **90**: 28–41.
- Liebig J, Peeters C, Oldham NJ, 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 USA* **97**: 4124–4131.
- Lockey KH. 1991.** Insect hydrocarbon classes: implications for chemotaxonomy. *Insect Biochemistry* **21**: 91–97.
- Mariano CSF, Pompolo SG, Delabie JHC. 2000.** Cito-

- genética das espécies gêmeas e simpátricas *Pachycondyla villosa* e *Pachycondyla* sp 'inversa' (Ponerinae). *Naturalia* **24**: 215–217.
- McCarthy ED, Han J, Calvin M. 1968. Hydrogen atom transfer in mass spectrometric fragmentation patterns of saturated aliphatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry* **40**: 1475–1480.
- McIver JD, Stonedahl G. 1993. Myrmecomorphy: morphological and behavioural mimicry of ants. *Annual Review of Entomology* **38**: 351–379.
- Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH. 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. In: Hillis DM, Moritz W, eds. *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Assoc. 45–126.
- Nelson DR. 1978. Long-chain methyl-branched hydrocarbons: occurrence, biosynthesis and function. *Advances in Insect Physiology* **13**: 1–33.
- Nelson DR, Carlson DA, Fatland CL. 1988. Cuticular hydrocarbons of Tsetse flies II: *Glossina fuscipes fuscipes*, *G. palpalis palpalis*, *G. p. gambiensis*, *G. tachinoides* and *G. brevipalpis*. *Journal of Chemical Ecology* **14**: 963–987.
- Nelson DR, Sukkestad DR, Zaylskie RG. 1972. Mass spectra of methyl-branched hydrocarbons from eggs of the tobacco hornworm. *Journal of Lipid Research* **13**: 413–421.
- Nelson LJ, Cool LG, Forschler BT, Haverty MI. 2001. Correspondence of soldier defense secretion mixtures with cuticular hydrocarbon phenotypes for chemotaxonomy of the termite genus *Reticulitermes* in North America. *Journal of Chemical Ecology* **27**: 1449–1479.
- Nowbahari E, Lenoir A, Clément JL, Lange C, Bagneres AG, Joulie C. 1990. Individual, geographical and experimental variation of cuticular hydrocarbons of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera: Formicidae): their use in nest and subspecies recognition. *Biochemical Systematics and Ecology* **18**: 63–74.
- Page RE, Metcalf RA, Metcalf RL, Erickson RH, Lampman RL. 1991. Extractable hydrocarbons and kin recognition in honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology* **17**: 745–756.
- Pérez-Bautista M, Lachaud J-P, Fresneau D. 1985. La division del trabajo en la hormiga primitiva *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Folia Entomologica Mexicana* **65**: 119–130.
- Pomonis JG, Fatland CL, Nelson DR, Zaylskie RG. 1978. Insect hydrocarbons. Corroboration of structure by synthesis and mass spectrometry of mono- and dimethylalkanes. *Journal of Chemical Ecology* **4**: 27–39.
- Pomonis JG, Nelson DR, Fatland CL. 1980. Insect hydrocarbons. 2. Mass spectra of dimethylalkanes and the effect of the number of methylene units between methyl groups on fragmentation. *Journal of Chemical Ecology* **6**: 965–972.
- Singer TL. 1998. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *American Zoologist* **38**: 394–405.
- Smith F. 1858. *Catalogue of hymenopterous insects in the collection of the British Museum. Part VI. Formicidae*. London: British Museum.
- Thomas ML, Parry LJ, Allan RA, Elgar MA. 1999. Geographic affinity, cuticular hydrocarbons and colony recognition in the Australian meat ant *Iridomyrmex purpureus*. *Naturwissenschaften* **86**: 87–92.
- Toolson EC. 1982. Effects of rearing temperature on cuticle permeability and epicuticular composition in *Drosophila pseudoobscura*. *Journal of Experimental Zoology* **222**: 249–253.
- Trunzer B, Heinze J, Hölldobler B. 1998. Cooperative colony founding and experimental primary polygyny in the ponerine ant *Pachycondyla villosa*. *Insectes Sociaux* **45**: 267–276.
- Valenzuela-Gonzalez J, Lopez-Mendes A, García-Ballinas A. 1994. Ciclo de actividad y aprovisionamiento de *Pachycondyla villosa* (Hymenoptera, Formicidae) en agroecosistemas cacaoteros del soconusco, Chiapas, Mexico. *Folia Entomologica Mexicana* **91**: 9–21.
- Vander Meer RK, Saliwanchik D, Lavine B. 1989. Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*: implications for nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology* **15**: 2115–2125.
- Wagner D, Tissot M, Cuevas W, Gordon DM. 2000. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 2245–2257.
- Ward PS. 1980. Genetic variation and population differentiation in the *Rhytidoponera impressa* group, a species complex of ponerine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Evolution* **34**: 1060–1076.
- Ward PS. 1985. The Nearctic species of the genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Quaestiones Entomologicae* **21**: 209–246.
- Wheeler WM. 1908. The ants of Texas, New Mexico and Arizona. (Part I). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **24**: 399–485.
- Yamaoka R. 1990. 3. Chemical approach to understanding interactions among organisms. *Physiology and Ecology Japan* **27**: 31–52.
- Young HP, Larabee JK, Gibbs AG, Coby S. 2000. Relationship between tissue-specific hydrocarbon profiles and lipid melting temperatures in the cockroach *Blattella germanica*. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 1245–1263.

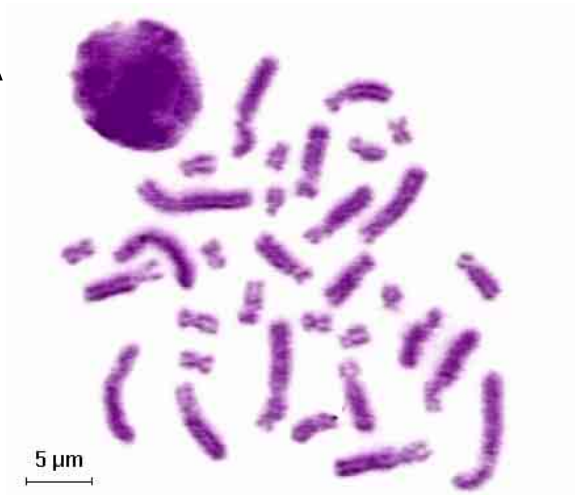
ANNEXE 1a

Caryotypes

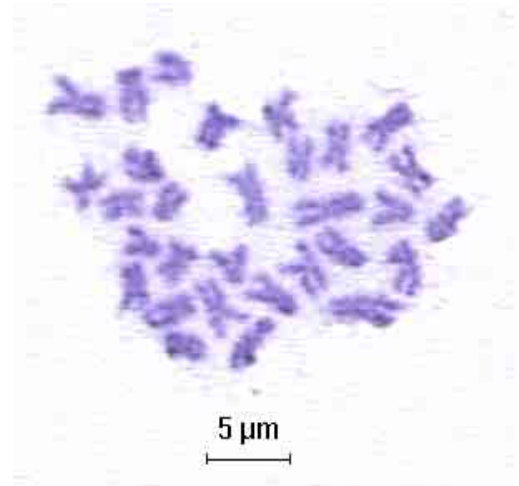
Nous avons étudié la structure caryotypique des trois taxa *P. villosa*, *P. inversa* et *P. subversa*. Les ganglions cérébraux de pré-pupes de mâles ont été colorés selon la technique de Imai *et al.* (1988) (Fig. 1a.1). Ces analyses ont été faites en collaboration avec C. S. F. Mariano et S. G. Pompolo (DBG/UFV Viçosa-MG, 36571-000, Brésil). Les résultats montrent que ces trois espèces présentent non seulement un nombre de chromosomes différent mais possèdent aussi des structures chromosomiques génétiquement incompatibles (Tab. 1a.1). A titre de comparaison nous avons reporté les résultats de *P. apicalis* et de *P. obscuricornis*.

Ces grandes différences de composition caryotypique entre les trois espèces rendent impossible toute formation d'hybride fertile, quelle que soit la combinaison du croisement. Ceci est conforté par des essais de reproduction en laboratoire: aucune tentative de copulation n'a été observée et aucun hybride n'a été produit.

Les trois taxa sont donc des espèces "vraies" avec une composition caryotypique très différente. Pourtant, malgré ces différences génétiquement fondamentales pour la constitution de l'espèce, il n'y a pas de grande altération morphologique. Ceci conforte l'idée de l'existence d'un "villosa morph" où tous les individus présentent peu de différences morphologiques et qui est discutée dans l'article 1.

A

Pachycondyla villosa 2n=34

B

Pachycondyla inversa 2n=30

C

Pachycondyla subversa 2n=26

Figure 1a.1A-C: Photos de la composition chromosomique des 3 taxa.

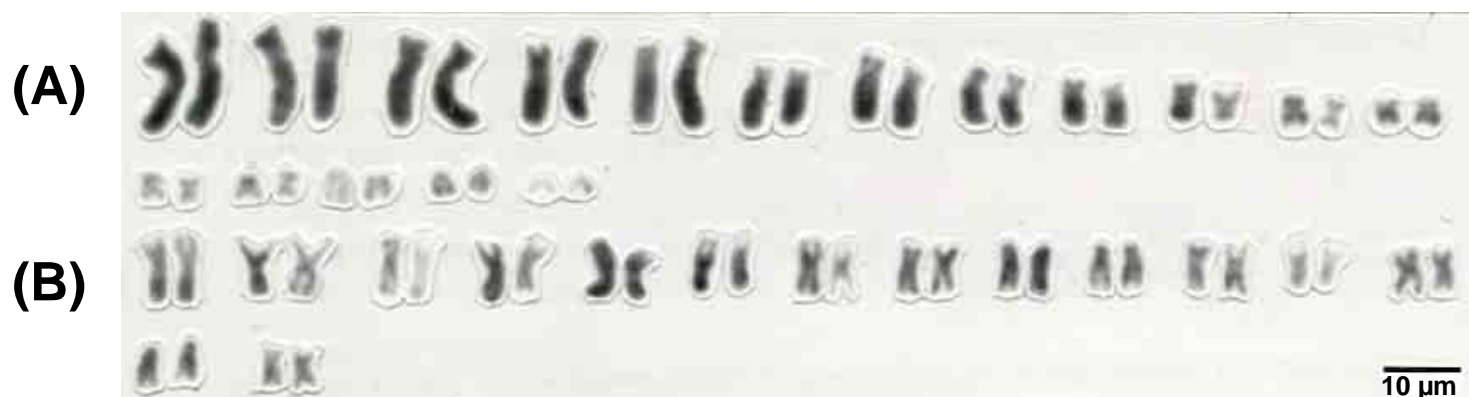


Figure 1a.2: Caryotype de **(A)** *P. villosa*, 2n=34 et **(B)** *P. inversa*, 2n=30.

Tableau 1a.1: Analyse caryotypique de plusieurs espèces de *Pachycondyla*.

Espèces	Nombres de chromosomes:			Nombre d'observation:	
	TOTAL	Acro-centrique	Meta-centrique	Colonies	Individus
<i>P. villosa</i>	34	28	6	5	25
<i>P. inversa</i>	30	6	24	9	30
<i>P. subversa</i>	26	20	6	3	15
<i>P. apicalis</i>	36	2	34	3	14
<i>P. obscuricornis</i>	42	26	16	6	20

ANNEXE 1b

Autres critères de distinction: réponses comportementales, profils chimiques de la PPG et quantités d'hydrocarbures.

Ainsi que nous le démontrerons dans les autres chapitres, d'autres critères biologiques permettent de distinguer les trois espèces. Tout d'abord les réponses comportementales (chapitre 2) où nous verrons que *P. inversa* (Pi) et *P. subversa* (Ps) s'avèrent plus agressives à l'encontre de *P. villosa* (Pv) qu'elles ne le sont entre elles. De plus, Pv possède une réponse comportementale qui lui est propre, donc spécifique. Concernant les profils chimiques des PPG, les tableaux 1b.1A et 1B comparent les HCs de la cuticule à ceux de la PPG pour les 3 espèces. Les différences entre cuticule et PPG seront davantage étudiées et comparées dans le chapitre 3, mais nous pouvons déjà remarquer que les trois espèces possèdent leur propre profil postpharyngien tout aussi différent que leur profil cuticulaire (Fig. 1b.1A, 1B et 2). Enfin, les quantités d'hydrocarbures présentent des différences entre les trois espèces (Annexe 3c).

Tableau 1b.1A: Pourcentages des HCs de la **cuticule** (CT) et de la **PPG des 3 espèces**

classés par temps de rétention (moyenne ± e.s.).

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

N°	Hydrocarbures	<i>P. villosa</i>				<i>P. inversa</i>				<i>P. subversa</i>			
		CT (n=22)		PPG (n=22)		CT (n=24)		PPG (n=23)		CT (n=19)		PPG (n=19)	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC23									tr		tr	
2	11-,9-,7-MeC23									tr		tr	
3	5-MeC23									tr		0,11	0,02
4	3-MeC23									tr		tr	
5	7,15-;5,17-;5,15-;5,11-diMeC23									tr		0,59	0,06
6	nC24									tr		0,12	0,02
7	3,7-diMeC23									tr		tr	
8	5,11,15-triMeC23									tr		tr	
9	5,9,17-triMeC23									tr		tr	
10	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24									tr		0,55	0,16
11	6-,5-MeC24									tr		0,35	0,03
12	4-,2-MeC24									tr		0,15	0,02
13	3-MeC24									0,13	0,07	0,12	0,05
14	6,12-diMeC24											tr	
15	5,15-diMeC24											0,32	0,02
16	nC25					0,32	0,05	tr		16,48	1,97	4,33	0,69
17	15-,13-,11-,9-MeC25					tr		0,14	0,04	5,88	0,60	11,36	0,69
18	7-MeC25					tr		tr		3,48	0,29	4,33	0,25
19	5-MeC25									11,05	0,56	8,62	0,39
20	3-MeC25					tr		0,10	0,04	21,49	1,38	7,61	0,77
21	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25									31,65	1,84	43,32	1,11
22	nC26	tr		tr		0,54	0,09	tr		0,92	0,34	tr	
23	3,17-;3,15-;3,13-diMeC25									1,27	0,16	2,57	0,13
24	3,11-;3,9-diMeC25					tr		tr					
25	5,13,17-triMeC25									0,41	0,08	1,27	0,07
26	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26					0,18	0,05	0,12	0,04	0,42	0,06	0,72	0,04
27	6-,5-MeC26					tr		tr		0,22	0,03	0,41	0,02
28	4-,2-MeC26					0,35	0,09	tr		tr		tr	
29	3-MeC26					0,15	0,05	tr		tr		tr	
30	6,18-;6,14-;5,17-diMeC26									0,21	0,02	0,86	0,04
31	4,18-;4,16-;4,14-diMeC26									tr		0,44	0,03
32	nC27:1					0,97	0,20	tr					
33	nC27	tr		tr		21,87	1,56	1,19	0,13	1,31	0,29	0,48	0,13
34	Xi-MeC27:1					0,44	0,12	tr					
35	3,15-;3,13-diMeC26									tr		tr	
36	3,11-;3,9-diMeC26					tr		tr					
37	Xi-MeC27:1							0,73	0,12				
38	13-,11-,9-,7-MeC27	tr		tr		13,78	2,35	17,26	2,80	1,20	0,14	1,95	0,21
39	5-MeC27	tr		tr		tr		tr		0,40	0,18	0,41	0,13
40	9,13-;11,15-diMeC27					0,33	0,09	2,79	0,36				
41	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27					0,13	0,05	tr		1,13	0,24	3,35	0,49
42	5,11-;5,9-diMeC27					tr		0,62	0,10				
43	3-MeC27					13,58	1,41	7,33	1,11	1,03	0,27	0,48	0,10
44	nC28:1					0,11	0,03	tr					
45	nC28	tr		tr		3,12	0,30	0,28	0,06	tr		tr	
46	3,19-;3,17-;3,15-diMeC27							tr		tr		0,24	0,02
47	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27					0,85	0,18	2,28	0,56				
48	5,15,17-triMeC27									tr		tr	
49	5,9,17-triMeC27									tr		tr	
50	Xi-MeC28:1					0,14	0,04	0,41	0,06				
51	14-,13-,12-,11-,10-MeC28					1,58	0,12	3,17	0,11				
52	6-MeC28					0,12	0,02	0,31	0,03				
53	4-,2-MeC28	2,23	0,35	tr		1,25	0,16	0,15	0,04				
54	5,19-;5,14-diMeC28					tr		0,81	0,16				
55	8,14-diMeC28					tr		0,31	0,10				

(suite)

N°	Hydrocarbures	<i>P. villosa</i>				<i>P. inversa</i>				<i>P. subversa</i>			
		CT (n=22)		PPG (n=22)		CT (n=24)		PPG (n=23)		CT (n=19)		PPG (n=19)	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
56	3-MeC28					0,41	0,04	0,19	0,05				
57	X-C29:1	tr		tr		0,87	0,22						
58	X'-C29:1	tr		tr									
59	6,14-diMeC28					tr		tr					
60	4,12-diMeC28					tr		tr					
61	2,13-;2,15-diMeC28	tr		tr									
62	nC29	1,65	0,31	tr		8,61	1,41	2,01	0,42	0,10	0,02	0,14	0,04
63	11-,15-, et Xi-MeC29:1					6,44	1,38	11,18	2,70				
64	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	0,29	0,07	0,14	0,03	14,45	1,53	28,62	2,24	0,42	0,17	0,34	0,12
65	5-MeC29					tr		tr		tr		tr	
66	13,17-;11,19-diMeC29	tr		tr									
67	diMeC29:1					0,61	0,29	2,55	0,97				
68	9,21-diMeC29	tr		tr									
69	11,15-;9,13-;9,15-diMeC29					1,14	0,31	4,08	0,64				
70	5,17-diMeC29									0,17	0,14	tr	
71	2-MeC29	tr		tr									
72	3-MeC29	7,73	0,79	0,15	0,02	5,80	0,67	5,41	0,62	tr		tr	
73	5,17-diMeC29									tr		0,53	0,44
74	5,11-;5,15-diMeC29					tr		0,38	0,08				
75	nC30	0,74	0,12	tr		tr		tr					
76	3,11-diMeC29					0,20	0,05	0,72	0,17				
77	Xi-MeC30:1					tr		0,20	0,05				
78	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	tr		tr		0,31	0,06	1,23	0,11				
79	8-,9-MeC30	tr		tr									
80	2-MeC30	3,99	0,48	0,16	0,02								
81	2,15-;2,13-;2,11-diMeC31	tr		tr									
82	nC31	0,36	0,07										
83	Xi-MeC31:1					0,43	0,13	1,09	0,32				
84	15-,13-,11-,9-MeC31	0,17	0,05	0,17	0,02	0,86	0,11	2,34	0,23	tr		tr	
85	7-MeC31					tr		tr					
86	13,19-;11,19-;11,15-diMeC31	tr		0,13	0,01	tr		0,17	0,09	tr		tr	
87	13,17-diMeC31					tr		tr					
88	9,21-diMeC31					tr		0,10	0,03				
89	7,19-diMeC31					tr		0,10	0,03	tr		tr	
90	7,15-diMeC31					tr		0,29	0,09				
91	3-MeC31	1,40	0,19	tr									
92	nC32												
93	Xi-MeC34:1	tr		tr									
94	17-,15-,13-,11-MeC33	tr		0,18	0,02	tr		0,71	0,05				
95	13,17-diMeC33	tr		0,39	0,04								
96	11,21-diMeC33					tr		0,45	0,03	tr		tr	
97	17-,15-,14-,13-,12-MeC34	tr		tr									
98	13,17-;15,19-diMeC34	tr		0,23	0,02								
99	12,22-diMeC34									tr		tr	
100	Xi-MeC35:1	0,17	0,05	0,99	0,11								
101	17-,15-,13-MeC35	0,52	0,11	2,14	0,15					tr		tr	
102	diMeC35:1	tr		tr									
103	13,23-diMeC35					tr		0,38	0,03	0,13	0,05	1,74	0,31
104	13,17-;13,19-diMeC35	6,42	0,64	15,91	0,91								
105	Xi-MeC36:1	tr		0,16	0,02								
106	14-MeC36	tr		0,41	0,02								
107	13,23-diMeC36									tr		tr	
108	14,18-;12,16-diMeC36	0,59	0,12	2,74	0,10								
109	Xi-MeC37:1	1,18	0,33	2,86	0,20								
110	19-,17-,15-,13-MeC37	5,42	0,30	4,74	0,41					tr		tr	
111	13,25-;15,23-diMeC37									0,12	0,04	1,13	0,24
112	15,19-;13,17-diMeC37	54,69	3,37	48,97	1,73								
113	13,17,21-;11,17,25-triMeC37	tr		0,77	0,09								

(suite)

N°	Hydrocarbures	<i>P. villosa</i>				<i>P. inversa</i>				<i>P. subversa</i>			
		CT (n=22)		PPG (n=22)		CT (n=24)		PPG (n=23)		CT (n=19)		PPG (n=19)	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
114	Xi-MeC38:1	tr		0,25	0,03								
115	15-,14-,13-,12-,11-,7-MeC38	tr		0,36	0,03								
116	13,25-;15,25-diMeC38									tr		tr	
117	14,18-;13,17-diMeC38	0,44	0,12	1,20	0,07								
118	12,16,20-triMeC38	tr		0,11	0,01								
119	13-MeC39:1	0,90	0,30	1,36	0,11								
120	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	3,03	0,42	2,73	0,17								
121	13,25-;13,23-diMeC39									tr		0,30	0,04
122	13,19-diMeC39	7,47	0,76	8,08	0,26								
123	13,17,21-triMeC39	tr		0,56	0,05								
124	20-,14-MeC40	tr		0,11	0,01								
125	14,20-diMeC40	tr		0,23	0,02								
126	Xi-MeC41:1	tr		0,19	0,03								
127	X'i-MeC41:1	tr		tr									
128	21-,19-,17-,15-,13-MeC41	0,13	0,06	0,48	0,04								
129	13,21-diMeC41	tr		0,99	0,08								
130	15,21-;13,19-diMeC41	0,20	0,09										
131	13,17,21-triMeC41	tr		0,18	0,02								
132	14,22-diMeC42	tr		tr									
133	13-MeC43	tr		0,14	0,02								
134	13,19-;13,21-diMeC43	tr		0,62	0,09								
135	13,17,21-triMeC43	tr		tr									
136	13,21-diMeC45	tr		0,50	0,06								

Tableau 1b.1B: HCs majoritaires (>2%) de la cuticule (CT) et de la PPG des 3 espèces

classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s.). Les numéros correspondent au tableau 1c.1A.

HCS en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

N°	Hydrocarbures	<i>P. villosa</i>				<i>P. inversa</i>				<i>P. subversa</i>			
		CT (n=22)		PPG (n=22)		CT (n=24)		PPG (n=23)		CT (n=19)		PPG (n=19)	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
16	nC25					0,32	0,05	tr		16,48	1,97	4,33	0,69
17	15-,13-,11-,9-MeC25					tr		0,14	0,04	5,88	0,60	11,36	0,69
18	7-MeC25					tr		tr		3,48	0,29	4,33	0,25
19	5-MeC25									11,05	0,56	8,62	0,39
20	3-MeC25					tr		0,10	0,04	21,49	1,38	7,61	0,77
21	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25									31,65	1,84	43,32	1,11
23	3,17-;3,15-;3,13-diMeC25									1,27	0,16	2,57	0,13
33	nC27	tr		tr		21,87	1,56	1,19	0,13	1,31	0,29	0,48	0,13
38	13-,11-,9-,7-MeC27	tr		tr		13,78	2,35	17,26	2,80	1,20	0,14	1,95	0,21
40	9,13-;11,15-diMeC27					0,33	0,09	2,79	0,36				
41	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27					0,13	0,05	tr		1,13	0,24	3,35	0,49
43	3-MeC27					13,58	1,41	7,33	1,11	1,03	0,27	0,48	0,10
45	nC28	tr		tr		3,12	0,30	0,28	0,06	tr	0,01	tr	0,01
47	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27					0,85	0,18	2,28	0,56				
51	14-,13-,12-,11-,10-MeC28					1,58	0,12	3,17	0,11				
53	4-,2-MeC28	2,23	0,35	tr		1,25	0,16	0,15	0,04				
62	nC29	1,65	0,31	tr		8,61	1,41	2,01	0,42	0,10	0,02	0,14	0,04
63	11-,15-, et Xi-MeC29:1					6,44	1,38	11,18	2,70				
64	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	0,29	0,07	0,14	0,03	14,45	1,53	28,62	2,24	0,42	0,17	0,34	0,12
67	diMeC29:1					0,61	0,29	2,55	0,97				
69	11,15-;9,13-;9,15-diMeC29					1,14	0,31	4,08	0,64				
72	3-MeC29	7,73	0,79	0,15	0,02	5,80	0,67	5,41	0,62	tr	0,01	tr	0,00
80	2-MeC30	3,99	0,48	0,16	0,02								
84	15-,13-,11-,9-MeC31	0,17	0,05	0,17	0,02	0,86	0,11	2,34	0,23	tr		tr	0,00
101	17-,15-,13-MeC35	0,52	0,11	2,14	0,15					tr		tr	0,02
104	13,17-;13,19-diMeC35	6,42	0,64	15,91	0,91								
108	14,18-;12,16-diMeC36	0,59	0,12	2,74	0,10								
109	Xi-MeC37:1	1,18	0,33	2,86	0,20								
110	19-,17-,15-,13-MeC37	5,42	0,30	4,74	0,41					tr		tr	0,02
112	15,19-;13,17-diMeC37	54,69	3,37	48,97	1,73								
120	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	3,03	0,42	2,73	0,17								
122	13,19-diMeC39	7,47	0,76	8,08	0,26								
TOTAL		95,38		88,81		94,72		90,88		96,49		88,89	

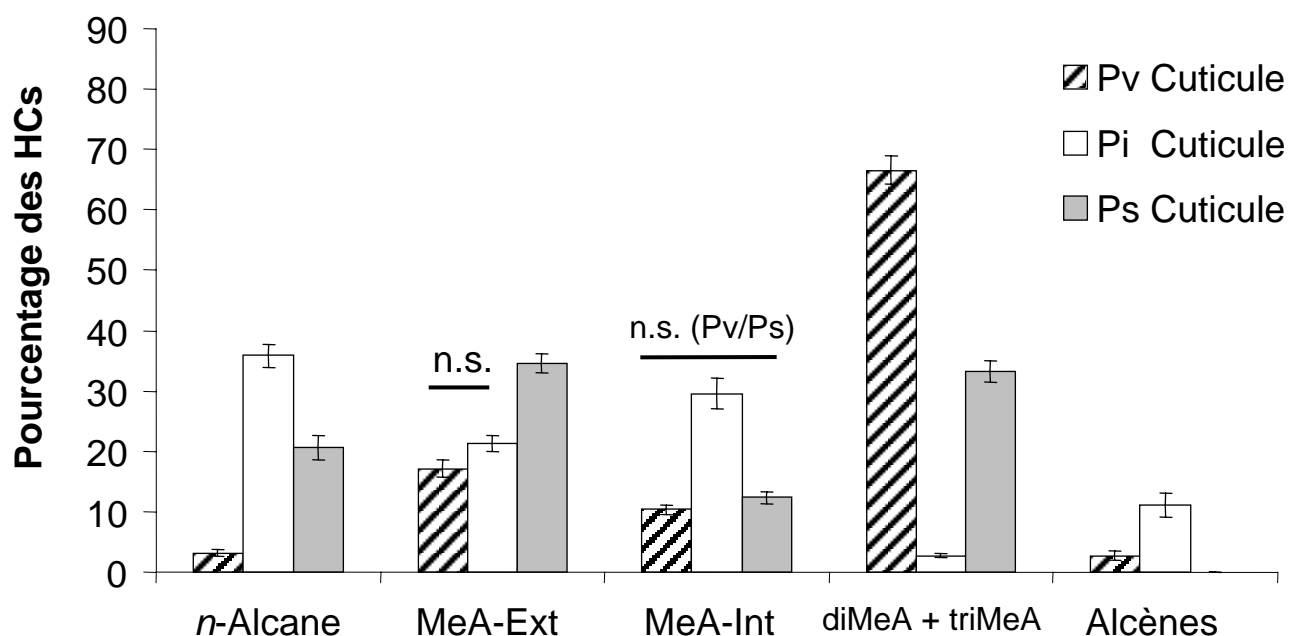


Figure 1b.1A: Pourcentages des HCs de la **cuticule** chez les **3 espèces**. Toutes les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) entre les 3 espèces ($n=18$ (Pv), 22 (Pi) et 16 (Ps)) sauf pour les groupes marqués n.s. MeA-Ext: monomethylalcane externe; MeA-Int: monomethylalcane Interne; diMeA: dimethylalcane; triMeA: trimethylalcane.

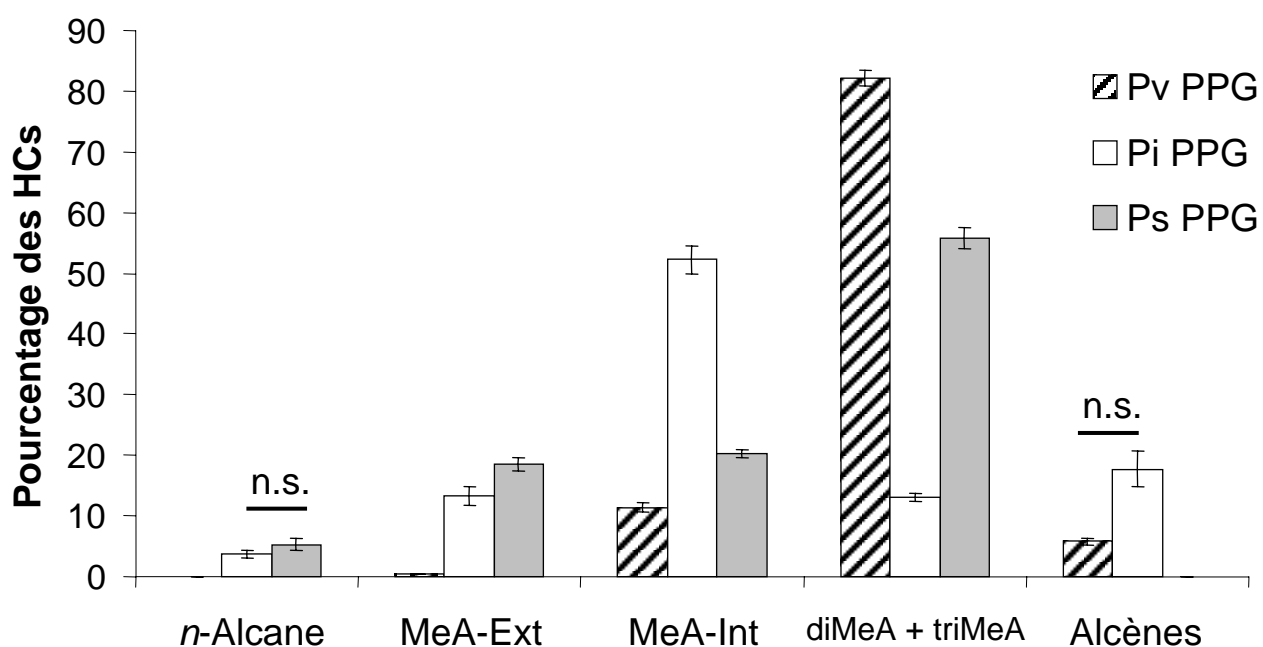


Figure 1b.1B: Pourcentages des HCs de la **PPG** chez **3 espèces**. Toutes les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) entre les 3 espèces ($n=18$ (Pv), 21 (Pi) et 16 (Ps)) sauf pour les groupes marqués n.s. MeA-Ext: monomethylalcane externe; MeA-Int: monomethylalcane Interne; diMeA: dimethylalcane; triMeA: trimethylalcane.

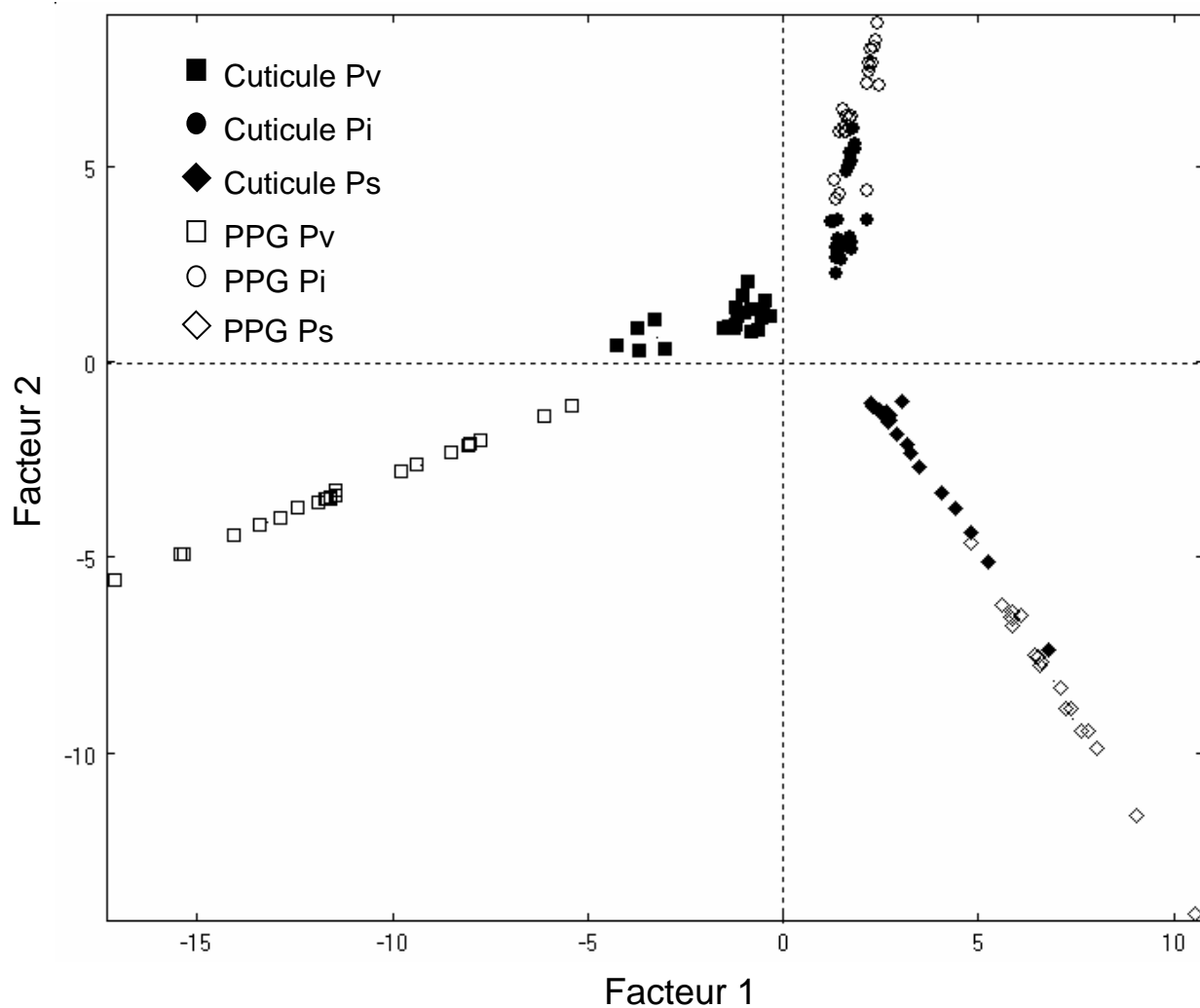


Figure 1b.2: Analyse en composantes principales des pourcentages d'hydrocarbures de la cuticule et de la PPG des 3 espèces. Les deux premiers facteurs F1 et F2 représentent respectivement 25 et 19% de la variance totale. Les analyses portent sur les variables normalisées afin d'obtenir de meilleures comparaisons (n= 36 (Pv), 43 (Pi) et 32 (Ps)).

CHAPITRE II

Chapitre II: Test comportemental du rôle des hydrocarbures impliqués dans la reconnaissance coloniale

Résumé de l'article 2

Les hydrocarbures (HCs) cuticulaires jouent un rôle important dans la communication chez les insectes, mais peu d'études ont clairement démontré le lien direct entre les HCs et la reconnaissance coloniale. Les fractions hydrocarbonée et *non* hydrocarbonée, ainsi que les trois principales classes d'HCs (*n*-alcanes, méthylalcanes et alcènes), ont été purifiées à partir des lipides cuticulaires de fourmis et ont été testées à l'aide d'un nouveau test éthologique. La technique d'immobilisation que nous avons mise au point présente deux avantages: elle permet l'observation du "moment clef" de la rencontre c'est-à-dire la courte période durant laquelle l'individu fait son choix et elle permet d'éviter toute forme de lésion. Ce qui n'est pas le cas avec un test classique de rencontre dyadique.

La reconnaissance de parenté des fourmis a été étudiée à trois niveaux d'interaction (intra-colonial, intra-spécifique et inter-spécifique) en utilisant 9 items comportementaux. Trois espèces proches chimiquement caractérisées ont été testées: *Pachycondyla villosa* (Pv), *P. inversa* (Pi) et *P. subversa* (Ps) (Lucas *et al.*, 2002) afin de mieux appréhender la diversité et la spécificité des réponses comportementales dans des systèmes biologiques proches. Chaque espèce possède sa propre réponse comportementale. De plus, la réponse de Pi et Ps vis-à-vis de Pv est significativement plus forte qu'elle ne l'est entre elles tandis que Pv présente le même degré d'agressivité vis-à-vis de Pi que vis-à-vis de Ps. Ces différences comportementales sont en accord avec l'analyse statistique de classification hiérarchique basée sur la composition en hydrocarbures cuticulaires des trois espèces, qui rapproche Pi de Ps. Dans une deuxième expérience, nous démontrons que seules la fraction hydrocarbonée et la fraction des alcanes branchés induisent une réponse comportementale chez les ouvrières de Ps.

ARTICLE 2

SPECIFIC RECOGNITION BEHAVIOURS ELICITED BY CUTICULAR HYDROCARBONS IN ANTS: A NEW ETHOLOGICAL TEST

C. Lucas^{1*}, D. B. Pho¹, D. Fresneau², J. M. Jallon¹

¹*Mécanismes de communication, Université Paris Sud, CNRS-UMR 8620, 91405 Orsay Cedex, France.*

²*LEEC, Université Paris Nord, CNRS-UPRESA n° 7025, F-93430 Villetaneuse, France.*

* Corresponding author. E-mail: christophe.lucas@ibaic.u-psud.fr.

Tel.: +33-169156517; Fax: +33-169157726.

ABSTRACT

Cuticular hydrocarbons (HCs) play important roles in insect communication but few studies clearly demonstrate the direct link between HCs and nestmate recognition. HC fraction and *non* HC fraction as well as the three principal classes of HCs (*n*-alkanes, branched alkanes and alkenes) were purified from cuticular lipids of ants and tested with a new ethological test. To avoid serious injuries and even death in classical dyadic tests an immobilizing technique was used. It allowed us to observe the encounter period i.e. the decision-making period in a given time, without any damage.

Nestmate recognition of ants was studied at three levels of interactions (intra-colonial, intra-specific and inter-specific) with nine behavioural items. Three close species already chemically characterized were used: *Pachycondyla villosa* (Pv), *P. inversa* (Pi) and *P. subversa* (Ps) (Lucas *et al.*, 2002) in order to better grasp the diversity and the specificity of

behavioural responses in close biological systems. Each species has its own behavioural responses. Moreover, the response of Pi and Ps towards Pv is significantly more important than it is between them whereas Pv is equally aggressive towards Pi and Ps. Furthermore, these differences correspond to the cluster analysis (Ward's method) of the cuticular hydrocarbon compositions which bring Pi closer to Ps. In a second experiment, we demonstrate that only the HC fraction and the branched fraction elicited a behavioural response of Ps workers.

Keywords: aggressive behaviour, nestmate recognition, Pachycondyla, Ponerinae, cuticular hydrocarbons, ethological test

INTRODUCTION

The mechanisms of nestmate recognition are difficult to grasp but necessary to understand the communication between social insects. Several studies show that cuticular lipids are involved in nestmate recognition (Jutsum, Saunders & Cherrett, 1979; Morel, Vander Meer & Lavine, 1988; Howard, 1993; Dahbi *et al.*, 1996; Singer, 1998) but few studies clearly demonstrate that the cuticular hydrocarbon fraction is responsible. Indeed, some ethological tests were made with whole cuticular extract and not with a purified hydrocarbon fraction. In a colony, application of alien cuticular extract on an individual elicited aggressive behaviour from its nestmates, whereas an alien ant treated with cuticular extract from this colony is accepted as a nestmate. However, the purification of hydrocarbons is an essential step prior to the bioassay of their impact in nestmate recognition (Vander Meer & Morel, 1998). The non hydrocarbon fraction from the cuticle is composed of fatty acids, alcohols, esters, glycerides, sterols, aldehydes and ketones (Lockey, 1988) and must also be tested. Recent studies on ant *Cataglyphis niger* (Lahav *et al.*, 1999) showed that only the purified hydrocarbon (HC) fraction from the cuticular extract is able to modify the aggressive behaviour of the ants as predicted from nestmate recognition cues. In the social wasp *Polistes dominulus*, Dani *et al.* (2001) found that treating an individual with some synthesised HCs of alien conspecific workers modified its acceptance by its nestmates. The same kind of analyses was made on *Apis mellifera* with various compounds (Bowden, Williamson & Breed, 1998; Breed, 1998a, b; Breed *et al.*, 1998). Nevertheless, in these studies the HC fraction or the synthesised HCs are deposited on living animals. Therefore, the behavioural tests are based on individuals with *modified* cuticular HC profiles and not only on the purified HC fraction. Dead animals previously washed with solvent were also used instead of living ones. However, it is not sure that they are neutral supports without any visual or “odour” informations (Gamboa, Reeve & Holmes, 1991). The purified HC fraction of *Pogonomyrmex barbatus* was deposited on small glass blocks and elicited behavioural responses in accordance with nestmate recognition cues (Wagner *et al.*, 2000). In this study which does not use living or dead animals as lures, the HC fraction was compared to the whole lipid extract but not to the *non* HC fraction.

Besides, the HC fraction itself plays various roles in insects, from water proofing, thermal insulation, protection from predators to chemical communication, reproduction isolation and kin and species recognition (Lockey, 1991; Blomquist *et al.*, 1998). These

different roles are directly linked to their great diversity in structure: number of carbon atoms, degree of unsaturation, number and positions of methyl branch and all kind of combinations which influence their physical properties (Gibbs & Mousseau, 1994; Gibbs & Pomonis, 1995; Gibbs, 1998a, b). To distinguish between the classes of HCs implicated in water proofing and those implicated in social communication it would be necessary to isolate them and test their activity.

Classic dyadic encounter tests are the most commonly used for the study of ant recognition. Unfortunately, this kind of test is not absolutely efficient (Fénéron, 1996). Indeed, the tested ants may not encounter each other for a long time but when they finally do so, rapid killing or avoidance occurs. Therefore, even if those dyadic tests inform us on the degree of aggressiveness and the social closure of species, they do not give us enough detailed behavioural data on the encounter moment that is to say the key instant when the ant determines its behavioural response. This is the reason why we have set up an immobilizing system allowing a precise investigation of the decision-making period. It also helps to overcome certain difficulties due to species. Indeed, as immobilization impedes injuries, analyses are more easily affordable with colonies which have few individuals, those which develop slowly and aggressive species which have a complete colonial closure. Moreover, we can study the same individuals several times in similar conditions of stimulation or in different ones: tolerance between different species/castes, behavioural impact of some chemicals like cuticular hydrocarbons, alarm/sex pheromone or any else chemical compounds, etc...

We report herein the behavioural test of the purified HC and *non* HC fractions as well as the three main classes of HCs (*n*-alkanes, branched alkanes and alkenes) isolated from the workers' cuticle. The three studied ant species (*Pachycondyla villosa*, *P. inversa* and *P. subversa*) are well known and have already been chemically characterized (Lucas *et al.*, 2002). Even if the behavioural data are obtained under artificial conditions, our results show that they are specific and fit to the current hypothesis on nestmate recognition.

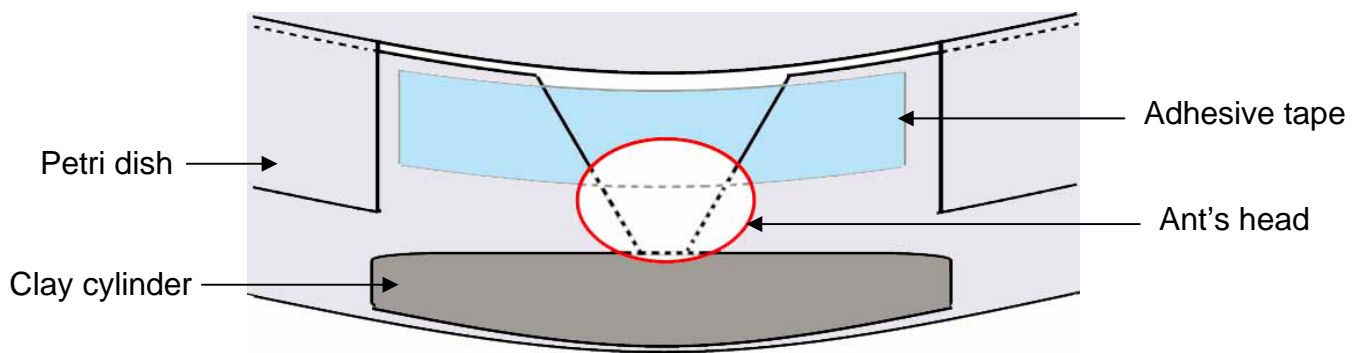


Figure 1A. “Front” view of the immobilizing system (Red circle: ant’s head).

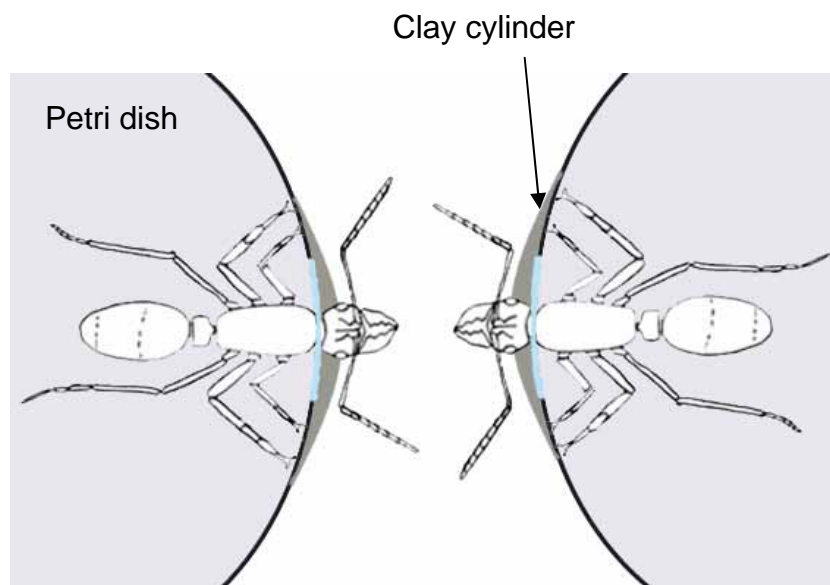


Figure 1B. The immobilizing system seen from above without the upper lid.

MATERIAL AND METHODS

STUDIED SPECIES

Colonies of three close species have been analysed: *Pachycondyla villosa* (Pv), *Pachycondyla inversa* (Pi) and *Pachycondyla subversa* (Ps) (Lucas *et al.*, 2002). They were collected from sympatric populations in the experimental fields of the Cocoa Research Center at Ilhéus, Bahia, Brazil. All the colonies were reared in the laboratory in artificial nests at least 6 months before being studied. The nests were maintained at $27 \pm 2^\circ\text{C}$, with about 60-80% relative humidity, and a 12L:12D photoperiod. All the colonies were provided with an identical diet (honey/apple mixture, *Calliphora sp.* larvae) twice a week. We have chosen these species in order to better grasp the diversity and the specificity of behavioural responses in close biological systems. Moreover, the large size of the individuals permits to obtain a great quantity of HCs and facilitates the behavioural observations.

IMMOBILIZING SYSTEM

Workers were picked up with clean forceps and put into chilled vials before immobilization. The immobilizing system was made of a Petri dish with a V-shaped opening in its rim (Fig. 1A). This shape let the head of an ant slip through it, whatever its size. A piece of adhesive tape was then put on the rim just behind the head to block the ant by the "V". A clay cylinder was put under the head to maintain it parallel to the camera view. The body of the animal was free inside the box. The lid of the Petri dish limited the diffusion of the volatile molecules that the ant can potentially produce (Fig. 1B).

All workers were foragers and were therefore approximately of the same age so that its effect on their behaviour was minimal. Naïve workers was isolated from the others in a calm environment in their respective disposable Petri dishes for two hours at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ and with about 60-80% relative humidity. Every test started 2 hours after the beginning of the lighting up period and finished 2 hours before its end. Workers were placed in the immobilizing system behind an opaque slide which had been previously cleaned with ethanol and dried. Five minutes later, the slide was taken off and the encounter was filmed for five minutes and recorded on a video tape. Recognition tests were carried out blind, i.e. without knowing the colonial identity of the tested workers, to assure the objectivity of each analysis (Gamboa *et al.*, 1991). Behavioural items were determined and analysed during 1 min starting 20 seconds

after taking off the slide. Statistical analyses using exact permutation tests were performed with StatXact 3.1 software (Cytel Software Corporation, Cambridge, MA, USA).

PROCEDURES

Two types of experiments were made. The first one was an encounter between two immobilized ants and the second one consisted in presenting a chemical mixture to one ant.

Experiment 1: The behavioural responses of Pv, Pi and Ps were studied on 116, 67 and 95 naïve workers respectively from 3 (Pv), 2 (Pi) and 2 (Ps) queen-right colonies. Every possible combination was realized. We considered three levels of interactions: (1) the intra-colonial level (ia-c) which is expected to lead to the lowest degree of response, (2) the intra-specific level (ia-s) within the same species and (3) the inter-specific level (ie-s) where each species encounters successively the two others.

Experiment 2: We studied the inter-specific behavioural responses of *Pachycondyla subversa* workers to different classes of cuticular HCs as well as to the *non* HC fraction of the extracts from Pv and Pi. Indeed, Ps has no alkenes at all (Lucas *et al.*, 2002) and in order to test as many different classes of cuticular hydrocarbons as possible we used Pv and Pi for chemical extractions and Ps for behavioural responses. We tested 161 Ps workers using cuticular extracts from 70 Pv and 140 Pi workers (queen-right colonies) separately. The cuticular HCs were extracted and separated into different classes as described later on. Amounts equivalents to about three times the quantity of HCs present on a worker's cuticle (30 µl) were deposited on a cone-shaped paper 5 min before each test. This paper had been previously washed with hexane 3 times, each time overnight. The control test consisted in only hexane deposition.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF CLASSES OF HYDROCARBONS

Workers - only foragers - picked up with clean forceps were placed altogether into chilled vials before extraction. Cuticular HCs were extracted from entire individuals by immersion during 5 min in 300 µl of hexane per worker with agitation. The samples were dried under nitrogen and dissolved in 10 µl of hexane per worker.

Five different classes were separated from the total cuticular extract: HC (from 25 to 45 carbon chain length), *non* HC, alkenes (only mono-unsaturated *n*-alkenes, mono- or

dimethylkenes), branched alkanes (mono-, di-, or trimethylalkanes) and *n*-alkanes. The HCs were separated from other cuticular lipids by thin layer chromatography (TLC) on Silica Gel 60 F-254 in hexane/diethylether/acetic acid solvent (80/20/2, v/v). Control lipids were chromatographed simultaneously and stained with I₂. The lipids of the sample were located according to these controls, scraped from the plates and extracted with hexane. Then, the total HC fraction (60 µg for Pv and 30 for Pi) was separated into saturated and unsaturated components using a TLC impregnated with 10% of AgNO₃ (w/w) in hexane/toluene (80/20, v/v). The methyl-branched components were further separated from the straight-chain components by shaking with crushed 5 Å molecular sieve (0.16 cm pellets, Alltech, IL, USA) in 2,2,4-trimethylpentane (iso-octane) (Warthen Jr & Uebel, 1979). The iso-octane extract was dried under nitrogen and dissolved in 10 µl of hexane per worker used for the extraction. The straight-chain components trapped by the molecular sieve may be freed by shaking it during 48 hours in pentane. Nevertheless as the rate of desorption is slow for a total recovery (O'Connor, Burow & Norris, 1962) we used commercially available compounds (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) in behavioural experiments with the linear components. The quantities used were the same as in the cuticular extracts. Thus, we have separated and tested 5 different fractions.

The purity of each tested sample was ascertained by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) carried out with a Fisons mass spectrometer MD 800 (electron impact at 70 eV) directly coupled with a Carlo Erba gas chromatograph GC 8065MS (Lucas *et al.*, 2002).

Table 1. Description of the nine behavioural items observed.

ITEMS	DESCRIPTIONS	PARAMETERS
mandible scissors movement	mandibles open and close slowly.	number of occurrences
mandible opening A (M.o.A) (Fig. 2A)	mandibles open widely ($\pm 120^\circ$) and remain in this position with the labium in.	cumulative time (in sec.)
mandible opening B	mandibles open widely ($\pm 120^\circ$) and remain in this position with the labium out. This behaviour is rare and lasts only few seconds.	cumulative time (in sec.)
biting attempt	mandibles open widely ($\pm 120^\circ$) and close rapidly.	number of occurrences
biting	only antennae can be bitten. This behaviour is very rare because of the immobilizing system and lasts only few seconds.	cumulative time (in sec.)
antennal exploration	antennae constantly move forward to the opposite ant or cone-shaped paper.	cumulative time (in sec.)
antennal backward move (A.b.m.) (Fig. 2B)	the major part of the antennae (the basal segment at least) are behind the axis which is formed by the front ends of the clypeus.	cumulative time (in sec.)
antennal contact	a part of the antennae gets in contact with the opposite ant or cone-shaped paper.	number of occurrences
antennal retraction (A.R.)	a part of the antennae gets in contact with the opposite ant or cone-shaped paper and are following by a rapid backward movement.	number of occurrences

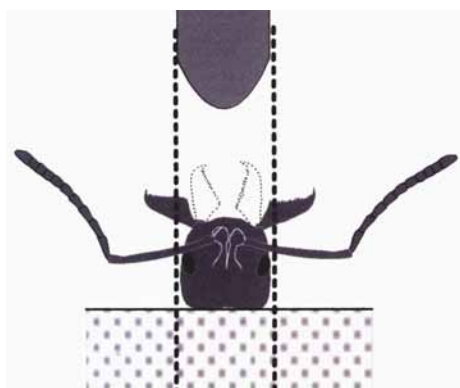


Figure 2A. Mandible opening A

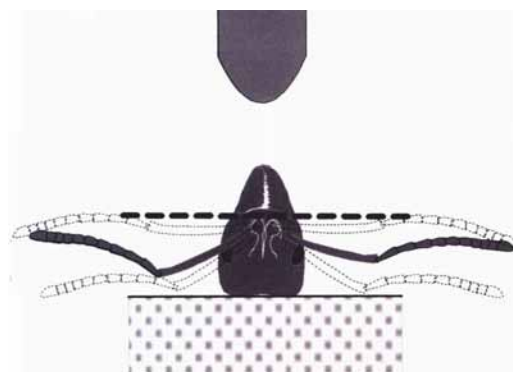


Figure 2B. Antennal backward move

RESULTS

OBSERVED BEHAVIOURS

Nine behavioural items were determined (Table 1) (Annexe 2a) and three of them seem to be relevant: mandible opening A (M.o.A) (Fig. 2A), antennal backward move (A.b.m.) (Fig. 2B) and antennal retraction (A.R.). During the first experiment, the counting of antennal retractions or contacts is difficult between the two ants, but for the second experiment, these behavioural items can be efficiently determined. This is why they are not taken into account in the first experiment. Moreover, we calculated an antennal retraction index equal to the number of antennal retractions divided by the total number of antennal contacts during 3 min.

BEHAVIOURAL RESPONSES OF EACH SPECIES

A. COMPARISON AT THE THREE LEVELS OF INTERACTION

A test of permutation based on the means of each behavioural item was used to compare the three levels of interaction (intra-colonial, intra-specific and inter-specific) for the three species. Two items clearly stood out: M.o.A and A.b.m.. Therefore, these were considered to be more characteristic of nestmate recognition than the eight other items (Hölldobler & Wilson, 1990) which cannot be easily related to nestmate recognition. The M.o.A duration was statistically different ($p < 0.05$) in all comparisons of the three levels of interaction for all species (Fig. 3A). Concerning A.b.m. durations, only those of Pi and Ps were significantly different for the three comparisons. For Pv the duration of this item did not change whichever ant is encountered, nestmate or not (Fig. 3B). When a Pv worker was confronted to a nestmate (intra-colonial encounter), its A.b.m. durations were longer than in any other species ($p < 0.05$). Concerning intra-specific encounters, the level of Pi's and Ps's activities were not different from Pv's. In inter-specific encounters, Pv's activity was shorter than those of others species. Thus, it is a behavioural difference which is specific to Pv. The long duration of A.b.m. observed in inter-specific encounters seems a behavioural characteristics of both Pi and Ps. Thus, two items durations of M.o.A and A.b.m. can be used in those two species to test their inter-specific discrimination abilities.

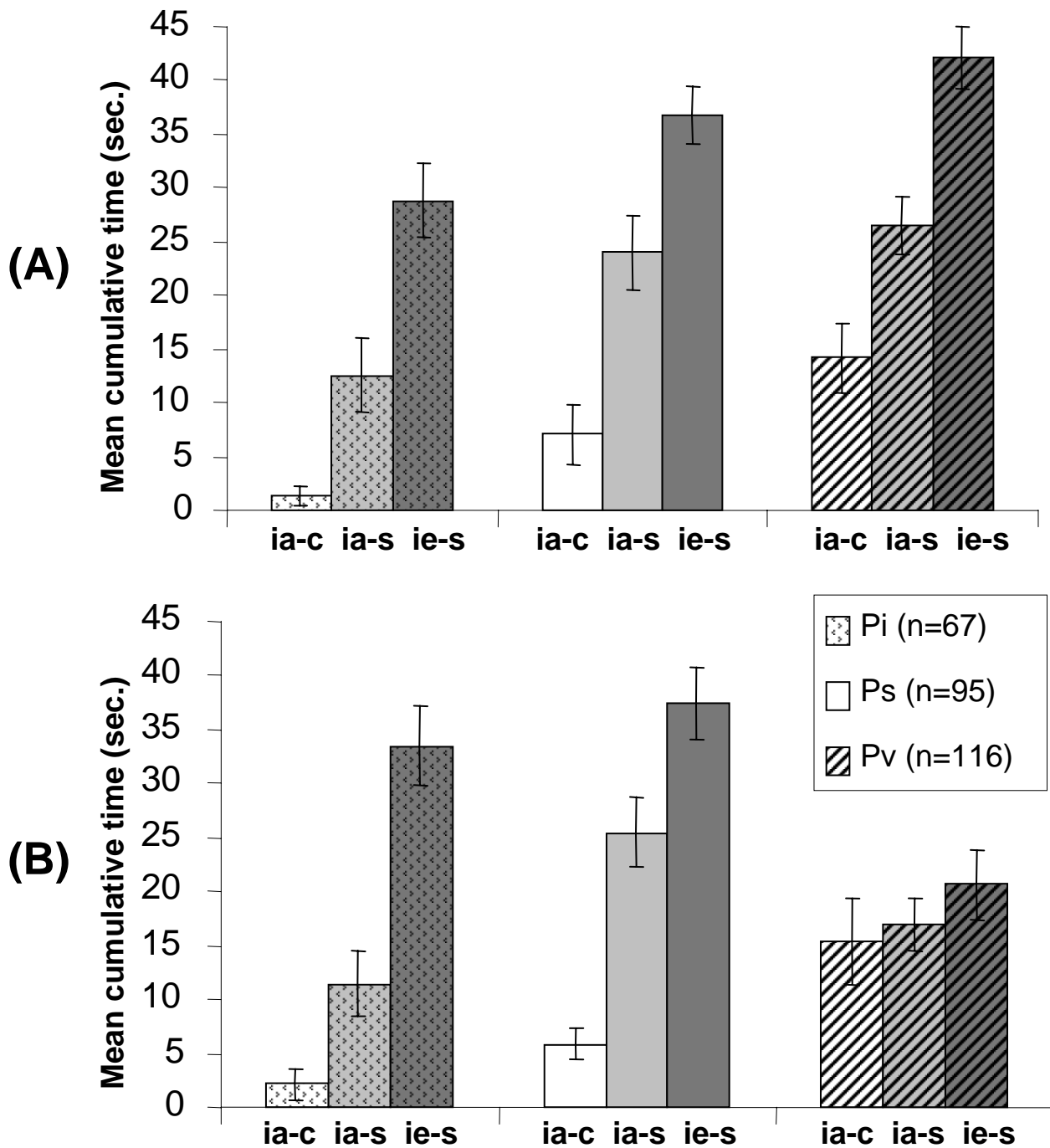


Figure 3. (A) Mandible opening A (M.o.A) and (B) Antennal backward move (A.b.m.) for the three levels of interaction, as evidenced in each species, n=number of tested workers.

B. CONFRONTATION OF EACH SPECIES TO THE TWO OTHERS

The inter-specific interactions were further analysed by comparing the responses of one species to each of the two others. These results suggest some hierarchy in the behavioural discrimination of species. The two behavioural activities of Pv did not show any statistical difference towards Pi nor towards Ps (fig. 4A): Pv was as responsive to Pi as to Ps, i.e. Pv did not show any behavioural discrimination towards the two other species. For Pi, the A.b.m. of Pi lasted longer towards Pv than towards Ps. Thus, Pi was more responsive to Pv than to Ps for this item (fig. 4B). The M.o.A and the A.b.m. of Ps lasted longer towards Pv than towards Pi: Ps was more responsive to Pv than to Pi for these two items (fig. 4C). The similarity of the behaviours of Pi and Ps between them and towards Pv as well as the absence of behavioural discrimination of Pv suggest some species proximity between Pi and Ps.

IMPACT OF THE CHEMICAL EXTRACTS ON Ps BEHAVIOUR

To try to relate the discriminative behaviour to specific groups of cuticular HCs Ps workers were confronted with one of the five different chemical classes of cuticular extracts. Out of 161 individuals 147, i.e. 91.30% of the encounters, presented clear antennal contacts with the cone-shaped paper whatever the type of the chemical classes there was on it. The mean duration of the first antennal contact with the sample was 12.14 sec. ($SD \pm 3.13$) and the mean number of antennal contacts was 40.08 ($SD \pm 3.67$) for all the tests. Individuals which presented no contact with the sample were eliminated without further analyses.

As for the preceding experiment the duration of the M.o.A and that of the A.b.m. appeared discriminant. We used also the A.R. index in this series of experiments. Mean values of the responses of Ps workers towards HC fractions ("HC response") showed a significant difference with the "control response" towards the solvent for the M.o.A, the A.b.m. and the A.R. index (Fig. 5A, B and C). On the other hands "*non* HC response" was not significantly different from the "control response". Moreover, the "HC response" for the two items (M.o.A and the A.b.m.) was not different from the "inter-specific response" of Ps shown in Figures 3A and 3B. These two results clearly demonstrate that nestmate recognition cues for Ps are contained in the HC fraction. Among HCs, only the fraction of methylalkanes induced significant behavioural responses (Fig. 5A, B and C). The statistical comparisons

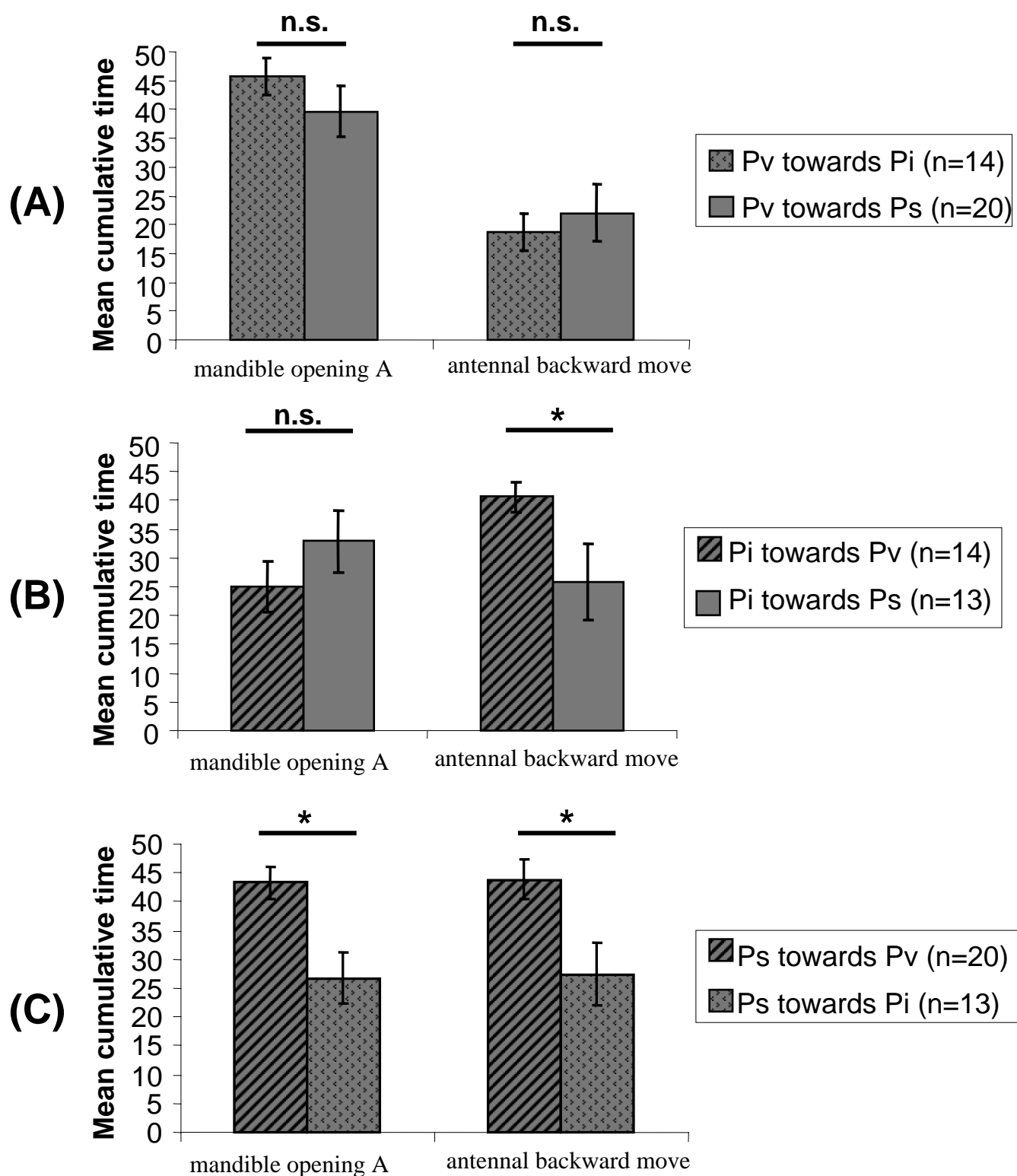


Figure 4. Behavioural responses of **Pv** (A), **Pi** (B) and **Ps** (C) in **inter-specific encounters**. Mean (in sec.) \pm S.D., n.s.: non significant, *: $p < 0.05$, n=number of tested workers.

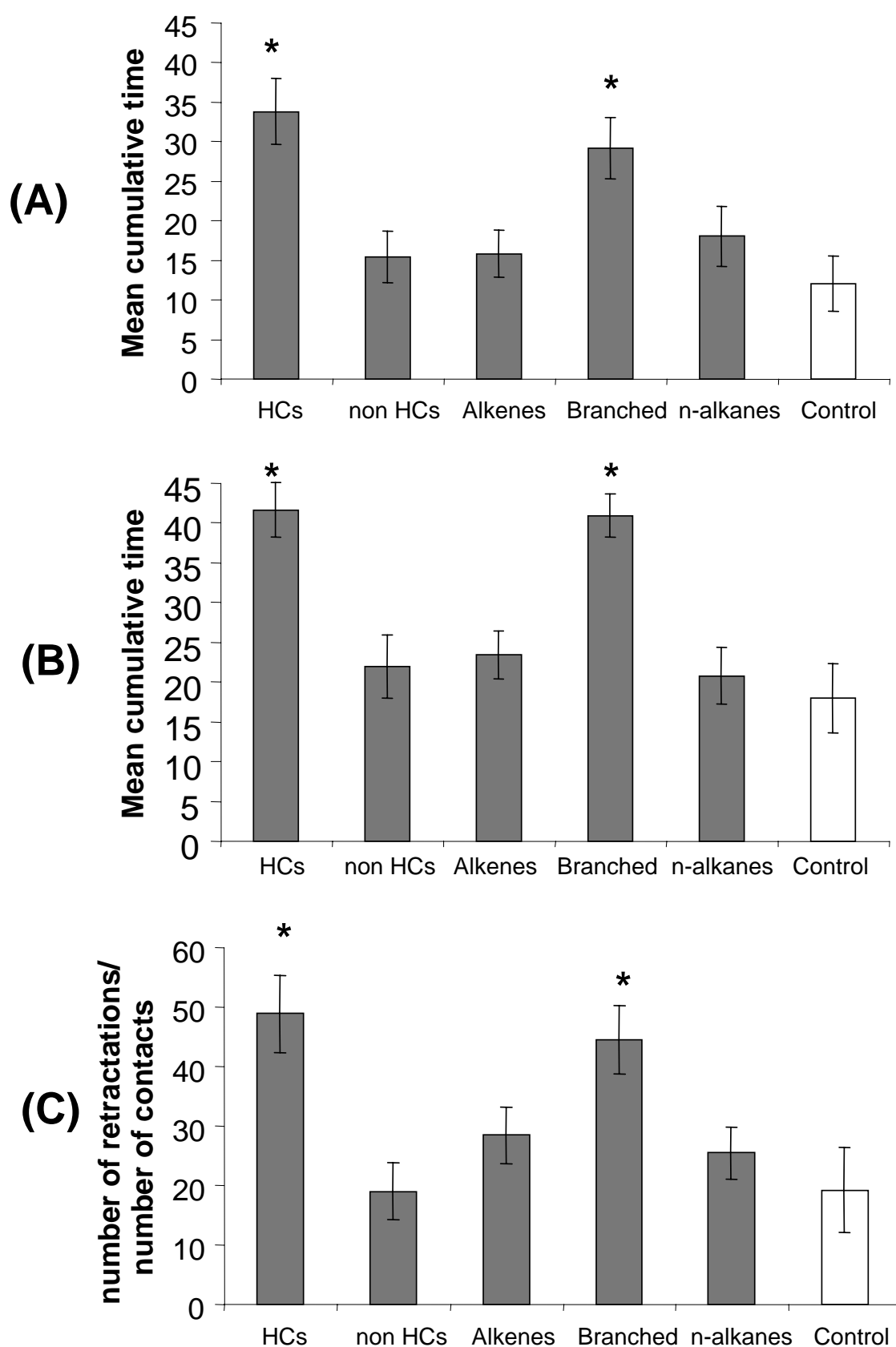


Figure 5. Behavioural responses of Ps towards chemical compounds tested for: **M.o.A** (A), **A.b.m.** (B) and **A.R. index** (C). Mean (in sec. or in occurrence) \pm S.D., n.s.: non significant, *: $p < 0.05$.

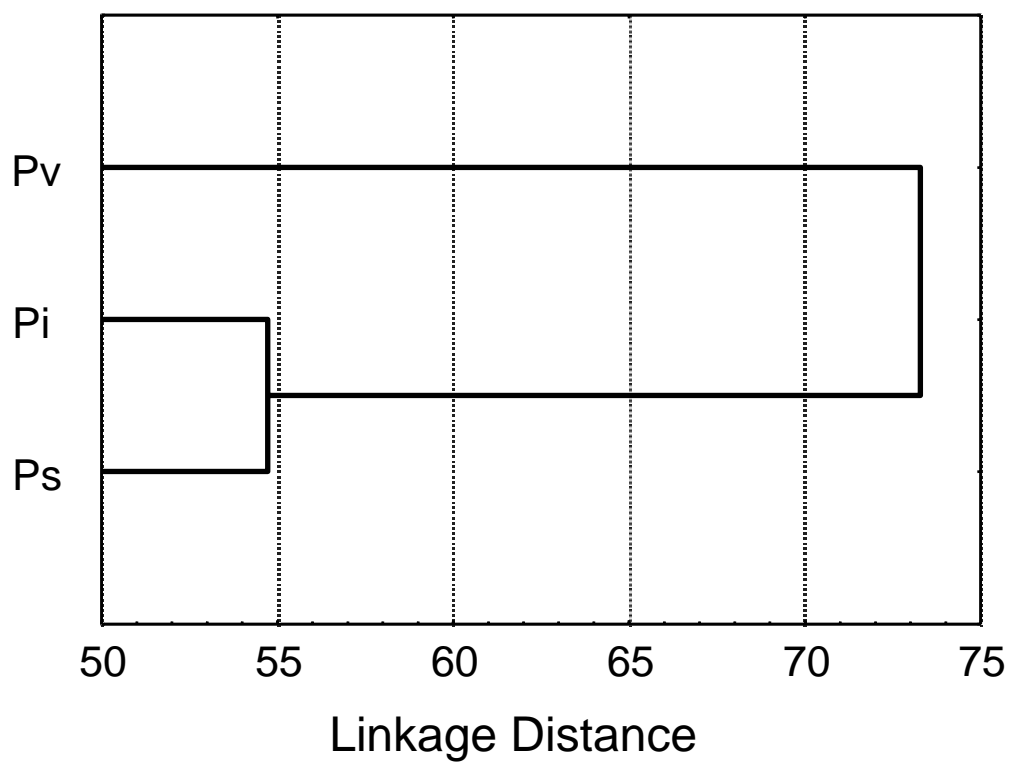


Figure 6. Cluster analysis of cuticular hydrocarbon compositions of workers of Pv, Pi and Ps (n= 22, 24 and 19 respectively).

between the "HC response" and the "branched response" showed no differences ($P>0.05$). These results strongly suggest that nestmate recognition cues for Ps are contained in the HC fraction and more precisely in the branched fraction only.

No statistically significant difference was observed when we compared the behavioural responses of Ps workers confronted to Pv HC classes or those from Pi (Annexe 2b). Nevertheless, mean duration responses for the M.o.A and the A.b.m. were lower towards the Pi HC fraction than in front of the Pv HC fraction as it was the case in the inter-specific encounters shown in Figure 4B.

We have previously shown (Lucas *et al.*, 2002) that the cuticular hydrocarbon compositions of Pv, Pi and Ps are different in their major components. However, the cluster analysis (using Ward's linkage method) of all the cuticular hydrocarbon components shows that Pi and Ps are closer to each other than to Pv ($n = 24, 19$ and 22 respectively) (Fig. 6). Thus, it is possible to hypothesize that Pv might not discriminate Pi from Ps owing to their relative chemical similarity whereas Pi and Ps would be more responsive to Pv than among themselves. The observed behavioural data confirm such a hypothesis.

DISCUSSION

Workers of three close *Pachycondyla* species are able to distinguish the three levels of differences (intra-colonial, intra-specific and inter-specific) to which they respond with an increasing aggressiveness. Moreover, each species displays its own behavioural response with a characteristic duration. The response of Pi and Ps to Pv is statistically more important than it is towards each other whereas Pv is equally responsive to Pi and Ps. Our behavioural, chemical and cluster analysis data support the current nestmate recognition hypothesis which relates the cuticular hydrocarbon compositions to the aggressive behaviours.

According to previous studies, the HC fraction has an impact on behaviour as demonstrated in *Pogonomyrmex barbatus* (Wagner *et al.*, 2000) using inorganic lures but the *non* HC fraction was not tested. In *Polistes dominulus*, behavioural responses obtained by using living animals as lures were elicited by the addition of only one or two HCs, which modified the cuticular profile (Dani *et al.*, 2001). As variations in the proportions of cuticular HCs have often been said to be involved in nestmate recognition (Blomquist *et al.*, 1998; Singer, 1998), studies with modifications of cuticular profiles may be biased. Nevertheless, the tested alkenes and methyl-branched alkanes appear to be recognition cues. Our study provides a new insight into the behavioural role of the different classes of HCs. The HC total fraction as well as the methyl-branched alkanes induce the same intensity ($p > 0.05$) in behavioural responses (Fig. 5A and 5B) as the inter-specific interaction (Fig. 3A and 3B). The mean of the A.b.m. response of Ps workers confronted to the control ("control response") shows an increased intensity ($p < 0.05$) compared to the "intra-colonial response". The tested ant is quieter in front of a nestmate than in front of a piece of paper deprived of "odor". The "*n*-alkanes responses" have never been significantly different from the "control response" not only for the three relevant items but also for all the other observed behavioural items. Indeed, *n*-alkanes have already been described as unable to play a role in insect communication (Espelie, Wenzel & Chang, 1990; Breed, 1998a; Dani *et al.*, 2001). The alkenes are the most volatile HC compounds and often the most chemically active in the communication in some insect families such as Coleoptera, Diptera and Hymenoptera (Singer, 1998). This fraction failed to elicit any behavioural response in Ps. In the ants that we have studied methylalkanes are the only effective fraction. It remains to know the reason why such compounds with no reactive groups could bind to receptors, if any, in ants' antennae.

Further studies would be done with preparative gas chromatography in order to divide more precisely the HC profiles into several testable fractions. The different HC classes from each fraction would then be purified and tested to determine their behavioural roles in social communication. Besides, more or less closely related studies may contribute to elucidating the problem. Thus, the study of lipophorin, a ubiquitous lipid carrier in insect haemolymph, has afforded some information. Comparison between HC compositions of lipophorin, postpharyngeal gland and cuticle suggests that *n*-alkanes and external monomethylalkanes do not participate in nestmate recognition (Lucas *et al.*, submitted).

The observed behaviours take place in an artificial context but this new ethological test permits to study detailed behavioural items which could not be detected in a classic dyadic context. The aim of this system is to test the behaviour of an ant confronted to stimuli and not to conclude on a natural behaviour. Indeed, the immobilizing system described here would provide an efficient tool to study the various aspects of social insect communication: patterns of behavioural responses, differentiation of sympatric species, tolerance between different species/castes, learning and memory, chemicals involved in nestmate recognition, alarm/sex pheromone or any else chemical compounds, etc...

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Chameron for discussions and comments on the manuscript, J.L. Durand for his helpful remarks on statistical analyses, A. Lenegrade, A. Drouard, C. Berthouly and B. Jacquemin for their contributions. We are grateful to C. Company for her comments on English. We are thankful to F. Lucas for the illustrations. This research was supported by the CNRS, by a CAPES COFECUB grant (944-188) and by a scientific expedition permit delivered by the Brazilian Ministry of Science and Technology (028/00).

REFERENCES

- Blomquist GJ, Tillman JA, Mpuru S, Seybold SJ. 1998.** The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure function and biochemistry. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE and Winston ML, eds. *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, Colorado: Westview Press. 34-54.
- Bowden RM, Williamson S, Breed MD. 1998.** Floral oils: their effect on nestmate recognition in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect. Soc.* **45**: 209-214.
- Breed MD. 1998a.** Chemical cues in kin recognition: criteria for identification, experimental approaches, and the honey bee as an example. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML and Espelie KE, eds. *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, Colorado: Westview Press. 126-155.
- Breed MD. 1998b.** Recognition pheromones of the honey bee. *Bioscience* **48**: 463-470.
- Breed MD, Leger EA, Pearce AM, Wang YJ. 1998.** Comb wax effects on the ontogeny of honey bee nestmate recognition. *Anim. Behav.* **55**: 13-20.
- Dahbi A, Cerda X, Hefetz A, Lenoir A. 1996.** Social closure, aggressive behavior and cuticular hydrocarbon profiles in the polydomous ant *Cataglyphis iberica* (Hymenoptera, Formicidae). *J. Chem. Ecol.* **22**: 2173-2186.
- Dani FR, Jones GR, Destri S, Spencer SH, Turillazi S. 2001.** Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Anim. Behav.* **62**: 165-171.
- Espelie KE, Wenzel JW, Chang G. 1990.** Surface lipids of social wasp *Polistes metricus* say and its nest and nest pedicel and their relation to nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.* **16**: 2229-2241.
- Fénéron R. 1996.** A new ethological test to study nestmate recognition in adult ants. *Insect. Soc.* **43**: 131-135.
- Gamboa GJ, Reeve HK, Holmes WG. 1991.** Conceptual issues and methodology in kin-recognition research: a critical discussion. *Ethology* **88**: 109-127.
- Gibbs AG. 1998a.** The role of lipid physical properties in lipid barriers. *Am. Zool.* **38**: 268-279.
- Gibbs AG. 1998b.** Water-proofing properties of cuticular lipids. *Am. Zool.* **38**: 471-482.

- Gibbs AG, Mousseau TA. 1994.** Thermal acclimation and genetic variation in cuticular lipids of the lesser migratory grasshopper (*Melanoplus sanguinipes*) : Effects of lipid composition on biophysical properties. *Physiol. Zool.* **67**: 1523-1543.
- Gibbs AG, Pomonis JG. 1995.** Physical properties of insect cuticular hydrocarbons : the effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* **112**: 243-249.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990.** *The ants*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Howard RW. 1993.** Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: Stanley-Hammelson DW and Nelson DR, eds. *Insect lipids : Chemistry, biodiversity and biology*. Nebraska: University of Nebraska Press. 179-226.
- Jutsum AR, Saunders TS, Cherrett JM. 1979.** Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Anim. Behav.* **27**: 839-844.
- Lahav S, Soroker V, Hefetz A, Vander Meer RK. 1999.** Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* **86**: 246-249.
- Lockey KH. 1988.** Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**: 595-645.
- Lockey KH. 1991.** Insect hydrocarbon classes : implications for chemotaxonomy. *Insect Biochem.* **21**: 91-97.
- Lucas C, Fresneau D, Kolmer K, Heinze J, Delabie JHC, Pho DB. 2002.** A multidisciplinary approach to discriminating different taxa in the species complex *Pachycondyla villosa* (Formicidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **75**: 249-259.
- Lucas C, Pho DB, Fresneau D, Jallon JM. submitted.** Purification of lipophorin from the ant *Pachycondyla villosa* and comparison between postpharyngeal gland, cuticle and lipophorin hydrocarbons. *Insect Biochem. Molec. Biol.*
- Morel L, Vander Meer RK, Lavine BK. 1988.** Ontogeny of nestmate recognition cues in the red carpenter ant (*Camponotus floridanus*), Behavioral and chemical evidence for the role of age and social experience. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **22**: 175-183.
- O'Connor J, Burow FH, Norris MS. 1962.** Determination of normal paraffins in C₂₀ to C₃₂ paraffin waxes by molecular sieve adsorption. *Anal. Chem.* **34**: 82-85.
- Singer TL. 1998.** Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Am. Zool.* **38**: 394-405.
- Vander Meer RK, Morel L. 1998.** Nestmate recognition in ants. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE and Winston ML, eds. *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, Colorado: Westview Press. 79-103.

- Wagner D, Tissot M, Cuevas W, Gordon DM. 2000.** Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.* **26:** 2245-2257.
- Warthen Jr JD, Uebel EC. 1980.** Comparison of the unsaturated cuticular hydrocarbons of male and female house crickets, *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae). *Insect Biochem.*: 435-439.

Annexe 2a

Description des différents items comportementaux observables avec le système d'immobilisation

Des pré-tests nous ont permis de définir l'éthogramme des réactions de l'animal dans le système d'immobilisation. Ces items sont comptabilisés en occurrence (nombre de fois où l'item a été observé) et en durée (temps total cumulé):

- **Cisaillement mandibulaire:** (occurrence)

Il s'agit d'une ouverture des mandibules suivies aussitôt de leur fermeture. Les mandibules restent dans l'axe de la tête. La durée de cet item est inférieure à une seconde.

- **Ouverture mandibulaire sans sortie du labium:** (durée cumulée ou occurrence)

Les deux mandibules sont maintenues ouvertes avec un angle d'environ 120°. En général, cet item a une durée supérieure à quelques secondes. Nous n'avons pas pris en compte dans cet item les cas où une seule mandibule s'écarte.

- **Ouverture mandibulaire avec sortie du labium:** (durée cumulée ou occurrence)

Même chose que précédemment, mais pendant l'ouverture mandibulaire la fourmi sort son labium.

- **"Tentative" de morsure:** (occurrence)

Le mouvement des mandibules est similaire à un cisaillement mandibulaire mais il est beaucoup plus rapide et saccadée, seules les positions initiale et finale des mandibules sont observables. La fermeture des mandibules s'effectue de façon très rapide. L'angle d'ouverture des mandibules est d'environ 90°-120°.

- **Morsure:** (durée cumulée)

Cet item a été très rarement (3 cas) observé compte tenu du système d'immobilisation. Une fourmi mord et maintient entre ses mandibules l'antenne de la fourmi opposée. L'antenne mordue a toujours été très rapidement libérée au bout de quelques secondes, sauf dans un seul cas sur tous les tests effectués.

- **Exploration antennaire:** (durée cumulée)

Les antennes sont en mouvement et sont dirigées vers l'avant. Elles peuvent être tendues ou légèrement pliées. Il arrive que la fourmi maintienne statiques ses antennes ce qui n'est pas considéré comme de l'exploration antennaire.

- **Position arrière des antennes:** (durée cumulée ou occurrence)

Une partie des antennes (au moins le scape) est derrière la ligne délimitée par le clypeus et forme un "W" plus ou moins prononcé. Nous n'avons pas pris en compte dans cet item les cas où une seule antenne est en arrière.

- **Contact antennaire:** (occurrence)

Lors des périodes d'exploration antennaire, les antennes entrent en contact avec la fourmi opposée (antennes ou tête) ou avec le cône en papier (imbibé de l'extrait hydrocarboné à tester). Cet item est très difficile à comptabiliser avec précision pour les rencontres entre fourmis.

- **Retrait antennaire:** (occurrence)

Cet item est très difficile à observer lors de rencontres entre fourmis. Il s'agit d'un retrait rapide et immédiat des antennes après un contact avec le cône en papier imbibé de l'extrait hydrocarboné à tester.

Annexe 2b

Réponses comportementales des ouvrières de *P. subversa* (complément)

Les moyennes des valeurs des trois items comportementaux importants sont reportées dans les tableaux 2b.1 et 2b.2 et représentées dans les figures 2b.1. Seules les fractions HC et Branchées induisent une réponse comportementale significativement différente de celle induite par le témoin. On peut noter pour l'ouverture mandibulaire A (Fig. 2b.1A) que la réponse comportementale de Ps face à un extrait *non* HC de Pv est significativement différente de celle de Ps face à un extrait *non* HC de Pi. Néanmoins, ces deux réponses sont non différentes du témoin et sont différentes de celles induites par les fractions HC correspondantes.

Contrairement à ce qui a été observé dans la figure 4B de l'article, nous ne voyons pas de différences significatives entre la réponse face à "Pv HC" et celle face à "Pi HC", même si l'on peut apercevoir une tendance similaire, à savoir une réponse plus faible face à "Pi HC" que face à "Pv HC". Ceci peut être dû à l'augmentation de l'agitation des individus lorsqu'ils font face au dispositif avec le cône en papier. En effet, on constate que le niveau d'activité des individus est augmenté si l'on compare la moyenne du témoin (un cône en papier sans extrait chimique) (Fig. 2b.1A et B) à celle de l'interaction intra-coloniale de Ps (Fig. 4B de l'article). Cette différence est non significative pour l'ouverture mandibulaire A, mais elle est significative pour la position arrière des antennes. Il existe donc une certaine forme "d'apaisement" lorsque la fourmi fait face à une sœur plutôt que lorsqu'elle fait face à du papier sans "odeur".

Tableau 2b.1: Réponses comportementales des ouvrières de *P. subversa* pour: **Ouverture mandibulaire A (Ouv. A)**, **Position arrière des antennes (Posi. Ant.)** et **Indice de retrait antennaire (Ind. Ret.)**. Moyenne (en sec. ou en occurrence) \pm E.S., n.s.: non significatif, en rouge: différence significative ($p < 0,05$).

Echantillon	Ouv. A		Posi. Ant.		Ind. Ret.		Probabilité		
	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Ouv. A	Posi. Ant.	Ret. Ind.
HCs	33,82	4,19	41,68	3,42	48,85	6,50	0,002	0,000	0,007
<i>non</i> HCs	15,43	3,25	22,01	3,99	18,98	4,80	0,494	0,502	0,975
Alkenes	15,85	3,00	23,42	3,05	28,49	4,80	0,434	0,300	0,283
Branchés	29,21	3,87	40,92	2,73	44,53	5,71	0,005	0,000	0,010
<i>n</i> -Alkanes	18,08	3,79	20,80	3,55	25,45	4,42	0,287	0,620	0,436
Témoin	12,10	3,51	18,00	4,31	19,24	7,07	/	/	/

Tableau 2b.2: Réponses comportementales des ouvrières de *P. subversa* pour: **Ouverture mandibulaire A (Ouv. A)**, **Position arrière des antennes (Posi. Ant.)** et **Indice de retrait antennaire (Ind. Ret.)**. Moyenne (en sec. ou en occurrence) \pm E.S., n.s.: non significatif, en rouge: différence significative ($p < 0,05$).

Echantillon	Ouv. A		Posi. Ant.		Ind. Ret.		Probabilité		
	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Ouv. A	Posi. Ant.	Ret. Ind.
Pi HCs	27,51	5,53	36,84	5,49	50,46	7,61	0,030	0,015	0,009
Pi <i>non</i> HCs	10,97	3,16	22,22	4,93	15,33	5,46	0,812	0,520	0,674
Pi Alkenes	13,81	3,64	24,53	2,58	28,33	6,90	0,737	0,248	0,371
Pi Branchés	28,96	6,38	44,48	4,27	46,61	9,03	0,027	0,001	0,028
Pi <i>n</i> -Alkanes	18,07	6,16	26,77	4,76	24,47	6,22	0,370	0,208	0,593
Pv HCs	39,64	5,98	46,14	3,99	47,24	10,91	0,001	0,000	0,041
Pv <i>non</i> HCs	25,25	6,07	21,55	7,52	25,25	9,12	0,073	0,656	0,597
Pv Alkenes	17,69	4,77	22,43	5,46	28,64	6,96	0,348	0,522	0,356
Pv Branchés	29,43	4,88	37,68	3,37	42,84	7,66	0,009	0,002	0,035
Pv <i>n</i> -Alkanes	18,08	5,02	17,32	4,74	26,35	6,53	0,337	0,913	0,470
Témoin	12,10	3,51	18,00	4,31	19,24	7,07	/	/	/

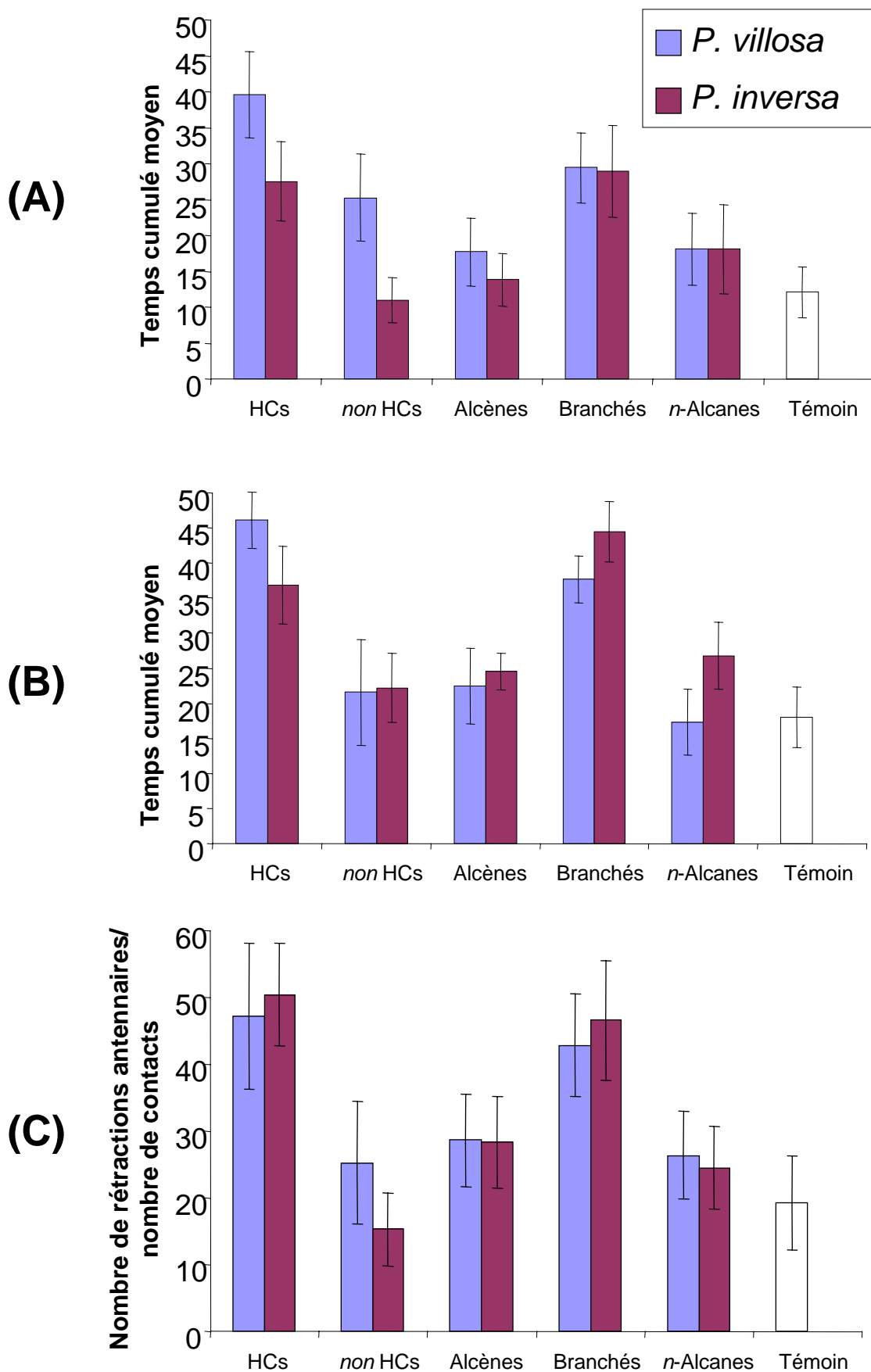


Figure 2b.1: Réponses comportementales des ouvrières de *P. subversa* pour: **(A) Ouv. A**, **(B) Posi. Ant.** et **(C) Ind. Ret.**. Moyenne (en sec. ou en occurrence) \pm E.S.; seules les moyennes des groupes “HCs” et “Branchés” sont significativement différents du témoin ($p < 0,05$).

CHAPITRE III

Chapitre III: Circulation des hydrocarbures et mise en place de l'odeur coloniale à l'échelle individuelle

Résumé de l'article 3

La lipophorine de l'espèce *Pachycondyla villosa* a été purifiée à partir d'ouvrières par ultracentrifugation dans un gradient de densité de NaBr. La lipophorine isolée possède un poids moléculaire natif d'environ 820 kDa et une densité de 1,114 g/ml. Elle est composée de deux apoprotéines d'environ 245 et 80 kDa. Les hydrocarbures (HC) extraits de la cuticule, de la glande postpharyngienne (PPG) et de la lipophorine purifiée ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et comparés. Les HC de la lipophorine sont identiques à ceux de la cuticule. De plus, la cuticule et la PPG possèdent une composition en HC qualitativement identique mais quantitativement différente. En effet, les extraits de la PPG présentent de faibles quantités de *n*-alcanes et de monométhylalcanes externes comparés à ceux de la cuticule/lipophorine. En revanche, les monométhylalcanes internes sont non significativement différents ($p > 0,05$) entre la PPG et la cuticule.

Il a été démontré que les HC de la PPG ont le même effet comportemental que ceux de la cuticule. D'autre part, les *n*-alcanes et les monométhylalcanes externes possèdent une température de fusion élevée. Nos résultats sur la différence de composition en HC entre la PPG et la cuticule/lipophorine suggèrent que les *n*-alcanes et les monométhylalcanes externes sont uniquement impliqués dans la lutte contre la dessiccation et non dans la reconnaissance de parentèle chez les fourmis. Enfin, nous discutons du rôle de la PPG et de la lipophorine dans la circulation interne des HC.

ARTICLE 3

PURIFICATION OF LIOPHORIN FROM THE ANT *PACHYCONDYLA VILLOSA* AND COMPARISON BETWEEN POSTPHARYNGEAL GLAND, CUTICLE AND LIOPHORIN HYDROCARBONS

C. Lucas^{1*}, D. B. Pho¹, D. Fresneau², J. M. Jallon¹

¹*Mécanismes de communication, Université Paris Sud, CNRS-UMR 8620, 91405 Orsay Cedex, France.*

²*LEEC, Université Paris Nord, CNRS-UPRESA n° 7025, F-93430 Villetaneuse, France.*

* Corresponding author. E-mail: christophe.lucas@ibaic.u-psud.fr

Tel.: +33-169156517; Fax: +33-169157726.

ABSTRACT

The lipophorin of *Pachycondyla villosa* workers was purified by NaBr density gradient ultracentrifugation. Purified lipophorin has a native molecular mass of approximately 820 kDa and a density of 1.114 g/ml. It is composed of two apoproteins of approximately 245 and 80 kDa. The hydrocarbon (HC) extracts from the cuticle, the postpharyngeal gland (PPG) and the purified lipophorin were analysed by gas chromatography and mass spectrometry and compared. The lipophorin HCs are very similar with those of the cuticle. Besides, there are no qualitative differences in HCs composition but clear quantitative differences between cuticle and PPG. The PPG extracts show a very low level of *n*-alkanes and external monomethylalkanes. The relative quantities of internal monomethylalkanes are not statistically significantly different ($P>0.05$) between PPG and cuticle.

Previous studies have shown that PPG's HC have a similar behavioural effect as cuticle ones. Besides, *n*-alkanes and external monomethylalkanes are associated with a higher melting temperature. Our results on the differences between the HC compositions of PPG and cuticle/lipophorin suggest that *n*-alkanes and external monomethylalkanes are involved only in waterproofing and not in nestmate recognition. Furthermore, we discuss the role of PPG and lipophorin in HC circulation.

Key words: lipophorin – Cuticle – postpharyngeal gland – hydrocarbon – ants – Pachycondyla villosa –Ponerinae– nestmate recognition.

INTRODUCTION

Over the past decades up to now, lipophorin (Lp) has elicited a great interest among insect scientists owing to its interactions with numerous biological effectors or metabolites. Indeed, this ubiquitous insect lipoprotein shuttles different classes of lipids between their sites of biosynthesis or absorption and storage or utilization in various target organs or tissues through the aqueous environment of hemolymph. It is associated with cholesterol, carotenoids, diacylglycerols and less frequently triacylglycerols, retinoids, phospholipids, hydrophobic hormones like juvenile hormone or sex pheromones, xenobiotics and hydrocarbons (Blacklock & Ryan, 1994; Schal *et al.*, 1998b). Lp has been shown to be the only hydrocarbon (HC) carrier in the hemolymph of flies, locusts, moths, cockroaches, termites, butterflies, bugs, mosquitoes and beetles (Chino & Kitazawa, 1981; Katase & Chino, 1982, 1984; Gondim *et al.*, 1989; Katagiri & De Kort, 1991; Capurro, Bianchi & Marinotti, 1994; Kim & Kim, 1994; Gu *et al.*, 1995; Pho, Pennanec'h & Jallon, 1996; Schal *et al.*, 1998b; Young *et al.*, 1999). HCs play important roles in two essential fields: waterproofing and chemical communication. By their hydrophobicity and their organization on the cuticle they make up an effective barrier against dessication (Noble-Nesbitt, 1991; Gibbs, 1998b; Rouault, Capy & Jallon, 2000; Young *et al.*, 2000). On the other hand, their involvement in chemical communication induces various behaviours in solitary as well as social insects: male-female intercourse (Pennanec'h *et al.*, 1995; Singer, 1998), reproduction isolation (Blomquist, Nelson & De Renobales, 1987; Chase *et al.*, 1992; Ferveur & Jallon, 1996), host plant (Eigenbrode & Espelie, 1995) and predator-prey interactions (Howard, 1993), chemical mimicry (Dettner & Liepert, 1994), species-/colony-/caste-recognition, (Vander Meer & Morel, 1998; Lenoir *et al.*, 1999) and fertility status signaling (Monnin, Malosse & Peeters, 1998; Cuvillier-Hot *et al.*, 2002; Heinze, Stengl & Sledge, 2002). HCs are also found in abundance in a gland unique to ants, the postpharyngeal gland (PPG). The HCs of this gland originate behaviours similar to those elicited by cuticle HCs. Thus, in a colony, an individual coated with alien PPG HCs undergoes aggressive behaviour from its nestmates, whereas an alien ant treated with PPG HCs from this colony is accepted as a nestmate (Soroker *et al.*, 1994; Lahav *et al.*, 1999). This has led to the hypothesis that Lp, PPG and cuticle are involved in a transport pathway inside and between individuals designed to elaborate a colony-specific HC blend ("gestalt") through self- and allo-grooming and trophallaxis (Soroker *et al.*, 1994;

Soroker, Vienne & Hefetz, 1995; Dahbi *et al.*, 1998; Hefetz *et al.*, 2001; Soroker *et al.*, submitted).

We report herein the purification and characterization of the Lp of *Pachycondyla villosa* and comparisons between cuticle, PPG and Lp HC profiles. Differences in their compositions shed new light on the potential roles of different types of HCs in waterproofing and chemical communication as well as on the involvement of PPG in the transport of HCs and in the formation of a colony "odour".

MATERIAL AND METHODS

ANTS

Queen-right colonies of the species *Pachycondyla villosa* (Lucas *et al.*, 2002) were collected from sympatric populations in the experimental fields of the Cocoa Research Center at Ilhéus, Bahia, Brazil. All the colonies were reared in the laboratory in artificial nests at least 6 months before being analysed. The nests were maintained at $27 \pm 1^\circ\text{C}$, with about 60-80% relative humidity, and a 12L:12D photoperiod. All the colonies were provided with an identical diet (honey/apple mixture, *Calliphora sp.* larvae) twice a week.

EXTRACTION PROCEDURE AND CHARACTERIZATION OF HYDROCARBONS

Three colonies were used (6 to 9 workers per colony) for chemical analysis. Workers (only foragers) were placed individually into chilled vials before analysis. Cuticular hydrocarbons (HCs) were extracted from each entire individual by immersion during 5 min in 200 μl of heptane with agitation. Workers were dissected and the post-pharyngeal gland (PPG) was individually collected. PPG's hydrocarbons (HCs) were extracted under the same conditions. The samples were dried under nitrogen and dissolved in 50 μl of hexane.

Each sample was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) carried out with a Fisons mass spectrometer MD 800 (electron impact at 70 eV) coupled directly with a Carlo Erba gas chromatograph GC 8065MS. The GC-MS was fitted with a 25QC2 BP1 methylsilicone capillary column (25 m x 0.22 mm ID x 0.1 μm). Injections of 5 μl of solution were made at 60°C . The oven temperature was increased 1 min after injection from 60 to 225°C at $20^\circ\text{C}/\text{min}$ and from 225 to 320°C at $3^\circ\text{C}/\text{min}$ (isotherm 10 min). Data were integrated using an IBM-PC with MassLab 1.27 as data acquisition, plotting and analysis software. Masses were scanned between 40 and 700 amu at 0.45 scan/s. The mass spectra of HCs were interpreted according to the criteria proposed by McCarthy *et al.* (1968), Nelson *et al.* (1972), Nelson (1978), and Pomonis *et al.* (1978; 1980).

COLLECTION OF HEMOLYMPH PROTEINS

Forty workers (only foragers) were picked up from one colony with clean forceps and put into chilled vials. Cuticular HCs were extracted from the group by immersion during 5 min in 40 ml of heptane with three-dimensional agitation. The ants were put at 5°C into an extraction buffer containing protein inhibitors (1 ml/worker). This buffer consisted of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM benzamidin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin, pepstatine and aprotinin at 20 µg/ml, glutathione at 2 mg/ml, soybean trypsin inhibitor at 2 mg/ml and 0.01% sodium azide. Head and legs were removed to facilitate the collection of hemolymph. Heads were stored apart for later dissection of PPGs and extraction of the HCs as described above. Hemolymph was obtained by centrifuging the remaining parts of the ants with 10 µm membrane tubes (VectaSpin 20, Whatman, Kent, UK) at 2000g/4°C for 2 min (Sigma centrifuge). The collected hemolymph was centrifuged at 8°C in a Kontron T 124 centrifuge (Kontron Instruments, Milano, Italy) with an A824 rotor at 18000 rpm for 35 min. The supernatant was withdrawn from the bottom. The protein content was precipitated by adding 0.533 g/ml ammonium sulphate at 4°C, and the precipitate was collected by centrifugation under the conditions described above (18000 rpm for 35 min). The pellet was redissolved in extraction buffer and recentrifuged to get a perfectly clear supernatant.

LIPOPHORIN PURIFICATION

Lp was isolated by density gradient ultracentrifugation as described by Shapiro *et al.* (1984). Supernatant was stained with 400 µl of Sudan Black (5 mg/ml in ethyleneglycol), mixed with 2.3 g of solid sodium bromide and adjusted to a final volume of 5 ml. The solution was transferred to a 11.5 ml ultracentrifuge tube and overlaid with a solution of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and 0.01% sodium azide. Tubes were sealed and centrifuged with a slow acceleration mode at 50,000 rpm for 60 min at 4°C in a Kontron TVF 65.13 vertical rotor. The stained Lp band was withdrawn and its concentration and salt removal were performed by ultrafiltration through Biomax-100 membrane (100 kDa cut-off, Ultrafree-4 centrifugal filter unit, Millipore, Bedford, MA, USA). The purity of Lp was checked by native and sodium dodecyl sulphate (SDS) polyacrylamide gel electrophoreses (PAGE) as described by Laemmli (1970). Silver staining was performed according to Blum *et al.* (1987). The molecular mass of Lp and its subunits

were determined with high and low molecular standard kits from Pharmacia (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Platelet myosin was added to the latter kit.

The density of isolated Lp was determined by comparative recentrifugation with a density gradient reference tube. Fractions (400 µl) were collected from the top of the tubes. Each fraction was measured for absorbance at 280 nm (Lp tube) and for refractive index (blank tube) to calculate the density.

LIPID EXTRACTION FROM LIPOPHORIN

Isolated Lp was submitted to lipid extraction as described by Folch *et al.* (1957). The chloroform extract was dried under nitrogen and redissolved in hexane. The HCs were separated from other lipids by thin layer chromatography (TLC) on Silica Gel 60 F-254 in heptane/diethylether/acetic acid solvent (80/20/2, v/v). The HC band was located by I₂, scraped from the plates and extracted with heptane, before analysis by GC-MS.

STATISTICAL ANALYSIS

Mann-Whitney *U*-tests were performed with Statistica 5.5 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) with the sequential Bonferroni correction of the *p*-values. In principal component analysis (PCA), on normalized variables for a better comparison, SPAD 3.0 software (Decisia, Paris, France) was used.

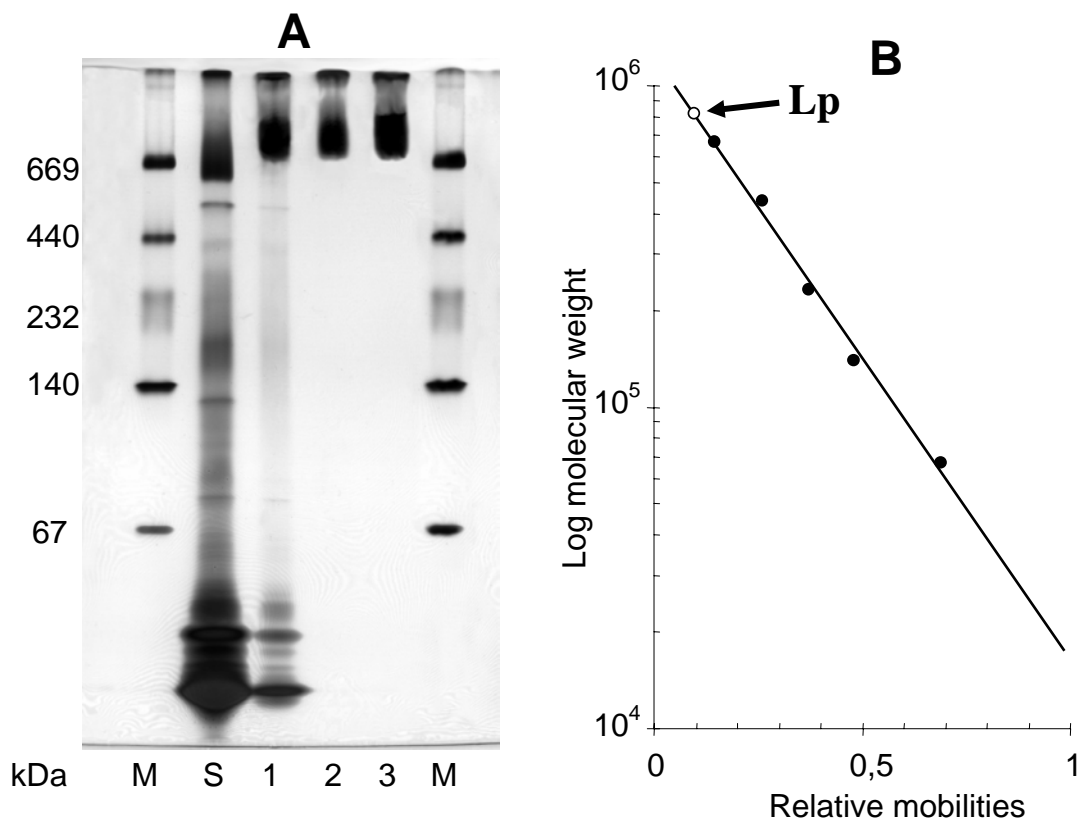


Figure 1. A: Electrophoretic analysis of NaBr gradient fractions by Native-PAGE. M: Molecular weight markers (in kDa) were thyroglobulin (669), ferritin (440), catalase (232), lactate dehydrogenase (140) and bovine serum albumin (67); S: Starting $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitated material; 1-3: lipophorin after successive ultracentrifugations.

B: Molecular mass determination. Open point : native lipophorin (Lp), 820 kDa.

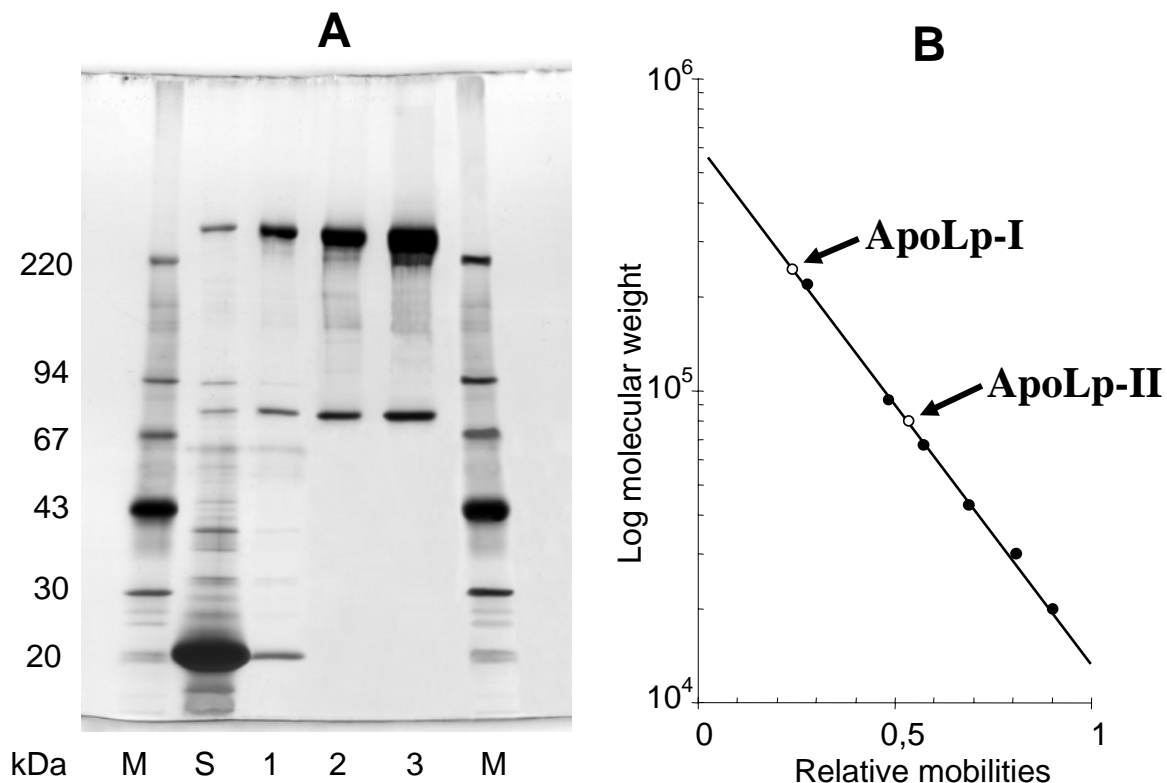


Figure 2. A: Electrophoretic analysis of NaBr gradient fractions by SDS-PAGE. M: Molecular weight markers (in kDa) were platelet myosin heavy chain (220), phosphorylase B (94), bovine serum albumin (67), ovalbumin (43), carbonic anhydrase (30), and soybean trypsin inhibitor (20); S: Starting $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitated material; 1-3: lipophorin after successive ultracentrifugations.

B: Molecular mass determination. Open points : apoLp-I: 245 kDa, apoLp-II: 80 kDa.

RESULTS

LIOPHORIN PURIFICATION

Three ultracentrifugation steps was necessary to obtain a purified Lp as shown by native (Fig. 1, lane 1-3) and SDS PAGE (Fig. 2, lane 1-3) with exponential gradients of polyacrylamide (5-25%). The lane with starting precipitated material (Fig. 1 and 2, lane S) shows a weak band of Lp and a multitude of proteins. The native PAGE indicated a molecular weight of approximately 820 kDa for the native protein (Fig. 1B). The Lp band is broad, due to its high concentration, which was used in order to reveal any kind of contaminant. As shown in Figure 3, there is only one peak of absorption ($\lambda = 280$ nm) for the purified Lp. On the top of the gel which corresponds to the interface between the concentrating and the resolving gels, a stained band is visible in all lanes even the standards' one. This is due to the formation of aggregates, which cannot enter the resolving gel.

A density gradient reference tube permits to locate Lp at a density of 1.114 g/ml (Fig. 3).

The molecular masses of the two subunits, apoLp-I and apoLp-II, are approximately 245 and 80 kDa, respectively (Fig. 2B). ApoLp-I has been shown to be unstable after isolation (King & Tobe, 1992). Indeed, the apoLp-I showed some signs of degradation with a few faint bands of greater mobilities (Fig. 2).

HYDROCARBON COMPOSITIONS OF CUTICLE, PPG AND LIOPHORIN

The complete description of the composition of cuticular HCs has already been performed on three *Pachycondyla* close species (Lucas *et al.*, 2002). *Pachycondyla villosa* was chosen for Lp isolation as this species exhibited the broadest pattern of HCs. Our present results allowed a comparison between PPG and cuticle HCs and no qualitative differences was observed. Indeed, HCs' peaks are always present in both, even if the quantities are too small to be measured. As it has been mentioned previously for the cuticle (Lucas *et al.*, 2002), *P. villosa* HCs cover a large range of chain length (C26-47), they have even or odd-numbered chain lengths, are saturated or unsaturated, linear or branched with branching occurring indifferently on even- or odd-numbered carbon atoms (Table 1). Internal monomethylalkanes (starting from the 7-methyl) appear as mixtures of unresolved isomers among which the 11- to 13- isomers are dominant. Dimethylalkanes are also observed as mixtures, but there is more

Table 1. Percentages of HCs from Cuticle, PPG (mean values (\pm s.d.), n=18) and lipophorin in order of increasing retention times.

Peak	Compound	Cuticle	PPG	Cuticle-pool	PPG-pool	Lipophorin	Peak	Compound	Cuticle	PPG	Cuticle-pool	PPG-pool	Lipophorin
1	nC26	tr	tr	tr	tr	tr	33	Xi-MeC35:1	0,20 (0,05)	0,97 (0,13)	0,42	0,31	0,60
2	nC27	tr	tr	0,11	tr	tr	34	17-,15-,13-MeC35	0,59 (0,12)	2,09 (0,15)	0,81	0,95	1,24
3	13-,11-MeC27	tr	tr	tr	tr	tr	35	Xi-diMeC35:1	tr	tr	tr	tr	tr
4	9-MeC27	tr	tr	tr	tr	tr	36	13,19-;13,17-diMeC35	6,65 (0,69)	15,44 (0,94)	3,99	6,41	4,09
5	7-MeC27	tr	tr	tr	tr	tr	37	Xi-MeC36:1	tr	0,16 (0,02)	tr	tr	0,14
6	5-MeC27	tr	tr	tr	tr	tr	38	14-MeC36	tr	0,40 (0,03)	0,25	0,26	0,29
7	nC28	tr	tr	0,17	tr	tr	39	14,18-;12,16-diMeC36	0,66 (0,14)	2,65 (0,11)	1,12	1,66	1,63
8	2-MeC28	2,60 (0,37)	tr	2,91	tr	tr	40	Xi-MeC37:1	1,39 (0,39)	2,83 (0,24)	3,30	1,72	2,96
9	X-nC29:1	tr	tr	tr	tr	tr	41	19-,17-,15-,13-MeC37	5,73 (0,31)	4,50 (0,43)	7,69	6,45	7,69
10	X'-nC29:1	tr	tr	tr	tr	tr	42	15,19-;13,17-diMeC37	50,23 (3,26)	50,10 (1,99)	35,95	61,78	42,44
11	2,15-;2,13-diMeC28	tr	tr	tr	tr	tr	43	13,17,21-;11,17,25-triMeC37	tr	0,69 (0,09)	0,75	0,53	0,64
12	nC29	1,90 (0,35)	tr	2,09	tr	0,44	44	Xi-MeC38:1	tr	0,24 (0,03)	0,52	0,22	0,37
13	15-,13-,11-,7-MeC29	0,35 (0,08)	0,14 (0,03)	0,35	tr	0,97	45	15-,14-,13-,12-,11-,7-MeC38	tr	0,34 (0,03)	0,60	0,37	0,49
14	13,17-diMeC29	tr	tr	0,13	tr	0,34	46	14,18-;13,17-diMeC38	0,50 (0,14)	1,16 (0,08)	1,19	1,14	1,11
15	11,19-diMeC29	tr	tr	tr	tr	tr	47	12,16,20-triMeC38	tr	0,10 (0,01)	tr	tr	tr
16	2-MeC29	tr	tr	tr	tr	tr	48	Xi-MeC39:1	1,08 (0,36)	1,33 (0,13)	3,24	1,40	1,84
17	9,21-diMeC29	tr	tr	tr	tr	tr	49	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	3,33 (0,48)	2,74 (0,20)	5,53	2,95	3,59
18	3-MeC29	8,43 (0,85)	0,15 (0,02)	6,70	tr	9,25	50	13,19-diMeC39	8,11 (0,84)	8,08 (0,28)	8,70	8,87	7,00
19	nC30	0,82 (0,14)	tr	0,58	tr	0,25	51	13,17,21-triMeC39	tr	0,53 (0,05)	0,69	0,57	0,63
20	14-,13-,11-MeC30	tr	tr	tr	tr	0,47	52	20-,14-MeC40	tr	0,11 (0,01)	0,17	tr	0,13
21	8-,9-MeC30	tr	tr	tr	tr	0,43	53	14,20-diMeC40	tr	0,23 (0,02)	0,23	0,22	0,18
22	2-MeC30	4,53 (0,50)	0,16 (0,02)	5,45	0,10	5,09	54	Xi-MeC41:1	tr	0,18 (0,03)	0,28	0,13	0,16
23	2,15-;2,13-;2,11-diMeC31	tr	tr	0,40	tr	1,02	55	X'i-MeC41:1	tr	tr	0,30	0,11	0,17
24	nC31	0,41 (0,08)	tr	tr	tr	tr	56	21-,19-,17-,15-,13-MeC41	0,16 (0,07)	0,48 (0,05)	0,81	0,46	0,55
25	15-,13-,11-MeC31	0,20 (0,05)	0,17 (0,03)	0,23	tr	0,52	57	15,21-;13,21-;13,19-diMeC41	0,25 (0,11)	0,99 (0,09)	0,98	0,98	0,76
26	13,19-;11,19-diMeC31	tr	0,13 (0,02)	tr	tr	tr	58	13,17,21-triMeC41	tr	0,17 (0,02)	0,14	0,17	tr
27	3-MeC31	1,56 (0,21)	tr	1,91	tr	1,84	59	14,22-diMeC42	tr	tr	tr	tr	tr
28	Xi-MeC34:1	tr	tr	tr	tr	tr	60	13-MeC43	tr	0,15 (0,02)	0,20	0,25	tr
29	17-,15-,13-,11-MeC33	tr	0,18 (0,02)	tr	tr	tr	61	13,19-;13,21-diMeC43	0,12 (0,06)	0,65 (0,11)	0,47	0,56	0,30
30	13,17-diMeC33	tr	0,37 (0,04)	tr	tr	tr	62	13,17,21-triMeC43	tr	tr	tr	tr	tr
31	17-,15-,14-,13-,12-MeC34	tr	tr	tr	tr	tr	63	13,21-diMeC45	tr	0,52 (0,07)	0,26	0,41	0,18
32	15,19-;13,17-diMeC34	tr	0,22 (0,02)	tr	0,11	tr							

The 'cuticle-pool', 'PPG-pool' and the lipophorin extract came from the same forty workers.

(**Bold typed compounds** : >2%; trace (tr) : <0.1%; X : unknown position of double bond; Xi : unknown position of internal methyl branch).

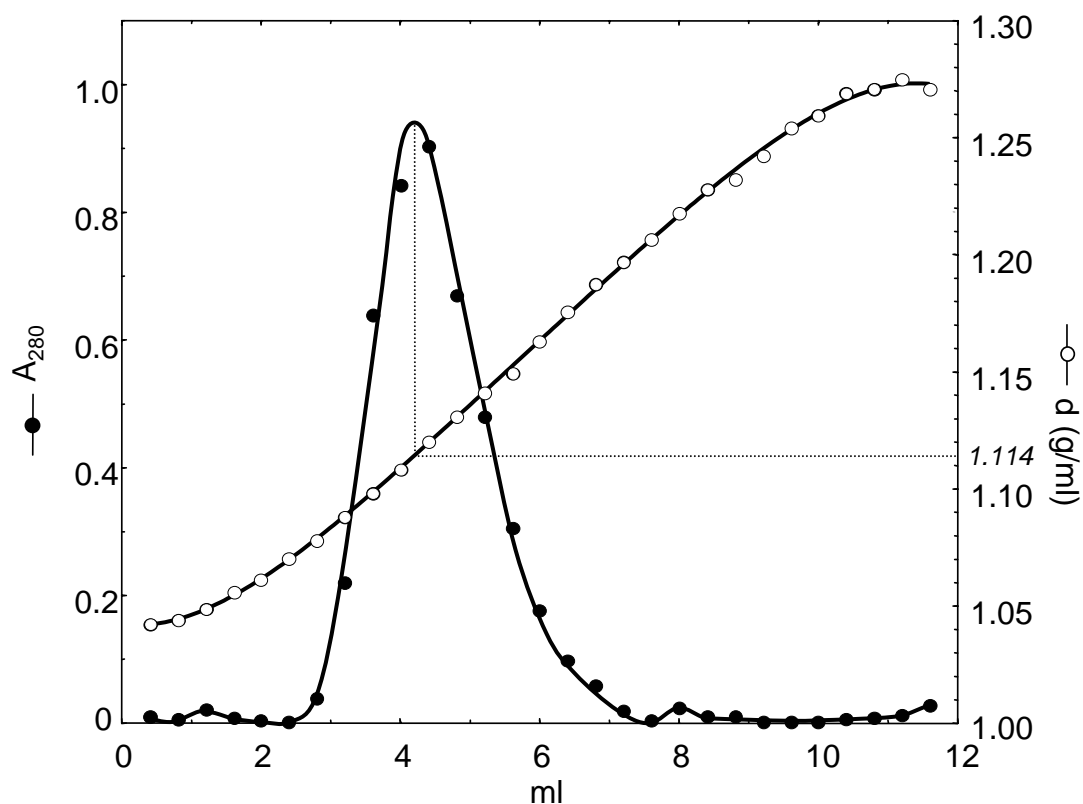


Figure 3. Density determination of isolated lipophorin.

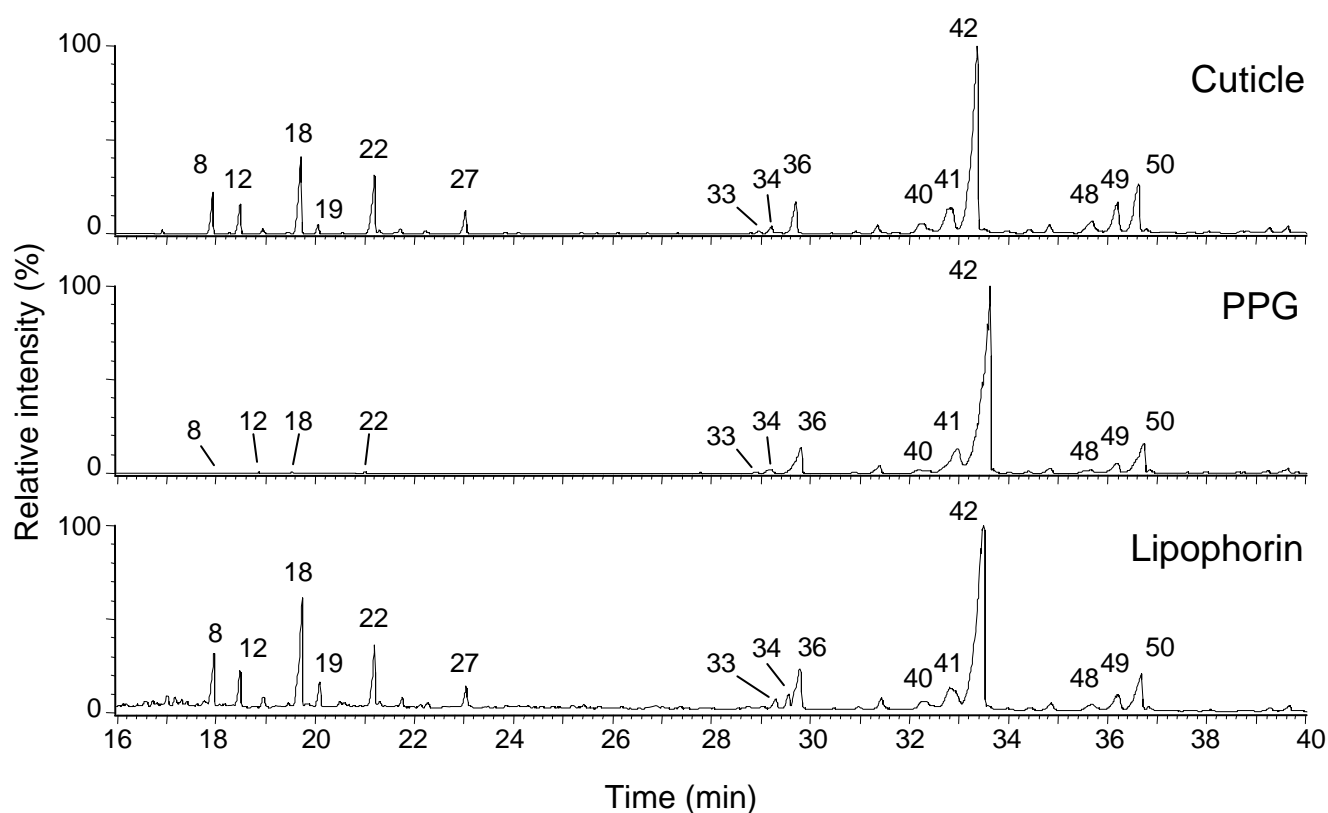


Figure 4. Total ion chromatograms of the HCs from Cuticle, PPG and lipophorin of the same workers. Numbers refer to the peaks listed in Table 1.

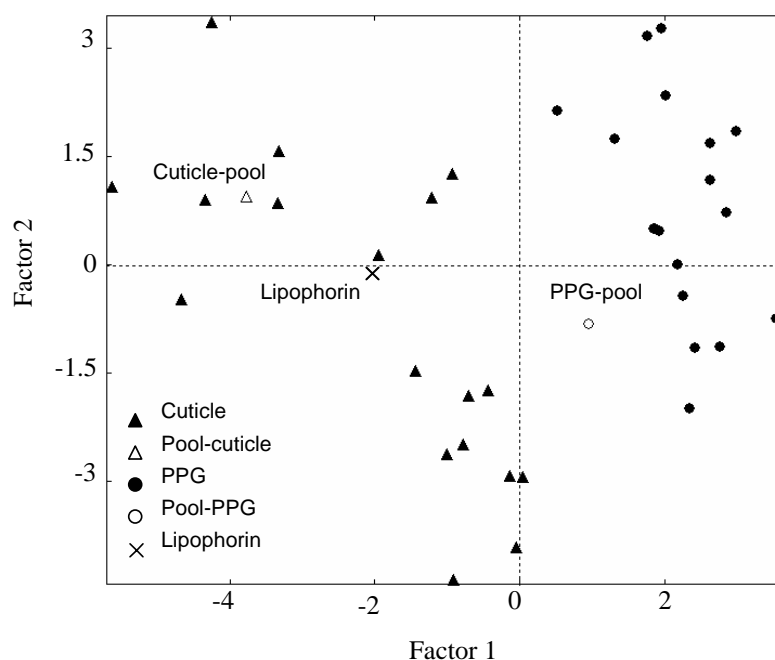


Figure 5. PCA of HC percentages of Cuticle, PPG and lipophorin. The first two factors F1 and F2 represent respectively 44 and 26% of the total variance. The variables were normalized during the analysis in order to obtain a better comparison. The ‘cuticle-pool’ and ‘PPG-pool’ points on the PCA represent the total HC extracts from the forty workers that have been used to isolate the lipophorin.

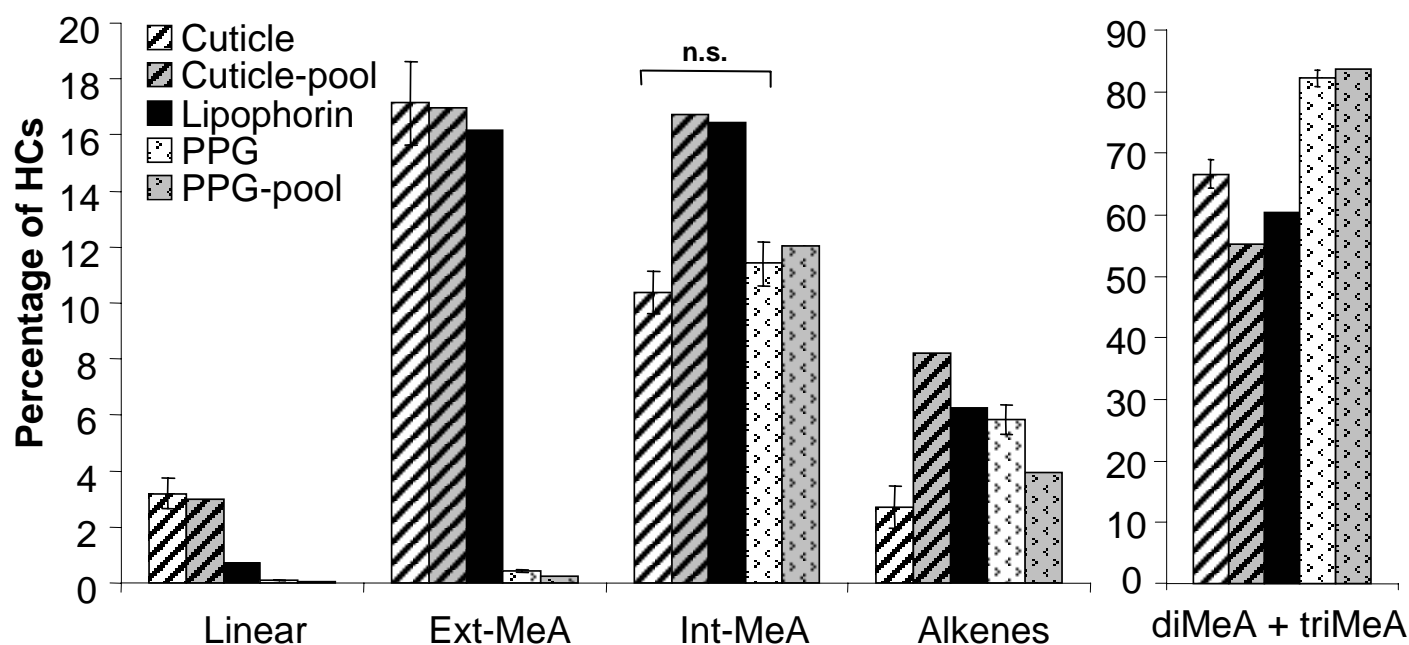


Figure 6. HC percentages of Cuticle, PPG and lipophorin. There are significant differences ($P < 0.05$) between cuticle and PPG values ($n = 18$) except for the group marked n.s. The ‘cuticle-pool’ and ‘PPG-pool’ represent the total HC extracts from the forty workers that have been used to isolate the lipophorin. Linear: n-alkane; Ext-MeA: external monomethylalkane; Int-MeA: internal monomethylalkane; diMeA: dimethylalkane; triMeA: trimethylalkane.

diversity in branchings. Trimethylalkanes are present in very small quantities and are more abundant in PPG (1.6 %) than in cuticle (trace). *n*-Alkadienes are completely absent.

The cuticle profiles are divided in two subgroups (Fig. 4). For instance, in the cuticle the first eluting subgroup (peaks 1-27, Table 1) represents 20.9 % of which *n*-alkanes and external monomethylalkanes (ext-MeA) are the main components (3.2 % and 17.1 % respectively). This subgroup is almost completely absent from the PPG profile and represents only 1.1 % of the total. In the cuticle, the later eluting subgroup (peaks 28-63) represents 79.1 % and is essentially composed of successive associations of small amounts of Xi-methylalkenes (Lucas *et al.*, 2002) (peaks 33, 40 and 48), monomethylalkanes (mainly the 13 isomer) (34, 41 and 49) and 13,17- and/or 13,19-dimethylalkanes (36, 42 and 50), in order of increasing abundance (2.7, 9.6 and 65 %). In the PPG, this subgroup represents 98.9 % and conserves the same organisation (same peak number) with the same increase order even if the relative percentages are more important (5.1, 9.3 and 73.6 %, respectively).

There are no qualitative differences between HCs from Lp and the PPG or cuticle (Fig. 4). However, Lp HCs are quantitatively very similar with those of the cuticle (Table 1). The principal component analysis (PCA) of the percentages of the prevalent HCs (mean percentage >2%) from PPG and cuticle shows two clearly separate clusters (Fig. 5). The ‘cuticle-pool’ and ‘PPG-pool’ points on the PCA represent the total HC extracts from the cuticles and the PPGs respectively, of the same forty workers that have been used to isolate the Lp. The first two factors, F1 and F2, represent 44 and 26% of the total variance respectively. The PPGs are positively correlated to axis F1 and, except for 1 point, cuticle and Lp are negatively correlated to this axis. Furthermore, the Lp point is plotted within the cuticle cluster as well as the ‘cuticle-pool’ point whereas the ‘PPG-pool’ point is near the PPG cluster.

The cumulative percentage of HCs sorting by classes confirms these observations (Fig. 6). The *n*-alkanes and ext-MeA are mostly absent from the PPG compared to the cuticle and Lp ($P < 0.001$). The internal monomethylalkanes are not statistically significantly different ($P > 0.05$) between PPG and cuticle. Conversely, the dimethylalkanes (and also trimethylalkanes which are in small quantities) are statistically significantly ($P < 0.001$) lower in cuticle than in PPG. The percentage of this class of HCs from Lp is also lower than that of the ‘PPG-pool’. Concerning *n*-alkenes, the cuticle presents lower quantities than the PPG ($P < 0.01$). Unfortunately, the quantities of *n*-alkenes are too small to be sorted by class like *n*-alkanes, but they are mainly internal methylalkenes.

DISCUSSION

Several studies have shown that Lp is a high density lipoprotein ($d = 1.063$ to 1.210 g/ml) with a native molecular mass of approximately 640 kDa and two apoproteins: apoLp-I (220-250 kDa) and apoLp-II (70-80 kDa) in a 1/1 stoichiometry (Chino, 1985; Kanost *et al.*, 1990; Law, Ribeiro & Wells, 1992; Van der Horst, Weers & Van Marrowjik, 1993; Blacklock & Ryan, 1994; Soulages & Wells, 1994). It is reported herein for the first time the purification and characterization of an ant Lp. The native molecular mass of *Pachycondyla villosa* Lp is approximately 820 kDa. This is particularly high in comparison with those of *Drosophila melanogaster* (640 kDa) (Pho *et al.*, 1996), cockroaches (*Blattella germanica*) (670 kDa) (Sevala *et al.*, 1999), mosquitoes (*Aedes aegypti*) (700 kDa) (Capurro *et al.*, 1994), Bombyx mori (730 kDa) (Kim & Kim, 1994), locust (*Locusta migratoria*) (580 kDa) (Van der Horst, 1990) and silkworm (*Philosamia sp.*) (700 kDa) (Pattnaik *et al.*, 1979). Although approximate this value suggests that the amount of associated lipids is still higher than the maximum 50% determined until now (Blacklock & Ryan, 1994). Nevertheless, Lp density of 1.114 g/ml is not different from the published data as well as the molecular masses of the two subunits apoLp-I (245 kDa) and apoLp-II (80 kDa).

Analysis of the HCs associated with Lp showed few quantitative differences compared to those of cuticle extracts as confirmed by the bivariate plot of all the extracts. This supports the role of the Lp as HC-carrier from the sites of biosynthesis, possibly oenocytes in the abdominal integuments (Schal *et al.*, 1998b; Young *et al.*, 1999, and references therein), to the cuticle as already shown by previous studies. In contrast, in PPG, our study showed that *n*-alkanes and ext-MeA (mainly 2- and 3-methylalkanes) are absent or greatly diminished.

These two sets of results allow us to precise the potential circulation circuit of HCs in ants. In former studies, the presence of radiolabelled HCs in both ants' PPG and cuticle after injection of labelled precursors has been observed. This has long supported a scheme of HC transport involving PPG and cuticle inside individuals as well as trophallaxies, self- and allo-grooming between individuals (Soroker *et al.*, 1994; Soroker *et al.*, 1995; Dahbi *et al.*, 1998; Soroker *et al.*, submitted). However, Schal *et al.* (1998a; 1998b) showed that, in the tiger moth *Holomelina aurantiaca*, 2-MeC17 and its pheromone homologues of similar chain lengths were specifically deposited by Lp into tubular pheromone glands whereas long chain HCs appeared only on the cuticle. Thus, there are two possibilities of interaction between PPG and Lp: selective transport of some Lp HCs through PPG membrane or delivery of all

HCs to the cuticle only. Some articles as well as our results lead us to choose the second possibility. Meskali *et al.* (1995) and Soroker *et al.* (1994; 1995; submitted) have studied the circulation of HCs tracing either (Z)-9-tricosene applied on the abdomen (*Camponotus vagus*) or radiolabeled HCs biosynthesised by the ants after abdominal injection of a radiolabeled precursor (*Cataglyphis niger* and *Pachycondyla apicalis*). In those studies, the tricosene or the radiolabeled HCs which were on one "donor" worker were rapidly transmitted to all the other "recipient" workers. Cuticles as well as PPGs were labelled, showing that "recipient" workers' PPGs were filled with the "donor" workers' HCs. However, *P. apicalis* workers with front legs restrained exhibited an important decrease of HCs in PPG at the same time the amount of HCs increased on front basitarsal brushes (Hefetz *et al.*, 2001). Similar results were obtained when workers have legs released but mouths blocked. The lack of self- or allogrooming was suggested to explain these decreases. Therefore, it may be assumed that Lp transports HCs through the hemolymph to the cuticle and principally to the brushes of the front legs but *not* to the PPG. The cuticle surface of the two front legs represents about 1/5 of the total cuticular surface and 27% of cuticular HCs are located on their brushes in *P. apicalis* (Soroker *et al.*, submitted). In *P. villosa* the front legs were licked during self-grooming and we assume that their HCs was accumulated in the PPG in the same manner as in *P. apicalis*. Then, the PPG HCs were dispatched again on the rest of an individual's cuticle or on its nestmate's cuticle during the grooming process. To complete the circulation circuit it is to be noticed that part of the PPG HCs is cleared via the alimentary canal, from the oesophagus to the crop of *Solenopsis invicta* and *P. apicalis* (Vander Meer, Glancey & Lofgren, 1982; Hefetz *et al.*, 2001). Like dietary HCs for grasshoppers (Blomquist & Jackson, 1973) and *Manduca sexta* (Nelson, Sukkestad & Terranova, 1971), the HCs are probably assimilated and transported again to the cuticular surface presumably by Lp (Schal *et al.*, 1998b).

If there is no direct transfer of HCs from Lp to the PPG, the differences we have observed between the cuticle and PPG requires a selective absorption into the PPG. Indeed, in *Pachycondyla villosa* *n*-alkanes and ext-MeA are absent in the PPG. *n*-Alkanes can exist in several crystalline states in different packing arrangements (Small, 1986) with the alkyl chains fully extended and parallel to one another and their melting temperatures (T_m) are high (Gibbs, 1998b). External methyl-branching have but a small effect on this properties (Gibbs & Pomonis, 1995; Gibbs, 1998b, a). Thus, they could be less easily collected during grooming. On the other hand, the presence of *n*-alkanes and ext-MeA on the cuticle is quite compatible with higher performance versus water loss insects need. Gibbs and Mousseau (1994) showed that grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) exhibited geographical variations

of their cuticular HC composition with latitude. Their Tms are higher with warmer temperature. Ants which are exposed to outside conditions exhibit a significantly higher percentage of *n*-alkanes on cuticles (this species have no ext-MeA) (Wagner, Tissot & Gordon, 2001). In the same way, *Myrmicaria eumenoides* (Kaib *et al.*, 2000) and *Pogonomyrmex barbatus* foragers (Wagner *et al.*, 1998) have a higher proportion of *n*-alkanes than nest maintenance workers. In *Blattella germanica*, *n*-alkanes and ext-MeA are more abundant in tissues that require greater waterproofing like the oothecal exterior or the epicuticle (Young *et al.*, 2000).

Despite the fact that some HCs are absent from the PPG compared to those of the cuticle, some experiments showed that PPG HCs keep a behavioural role in nestmate recognition. Indeed, the application of nestmate PPG HCs on alien ants modifies the workers' aggressive behaviour as predicted by recognition cues (Soroker *et al.*, 1994; Lahav *et al.*, 1999). If this is also true for *Pachycondyla villosa* then *n*-alkanes and ext-MeA are to be excluded from the recognition cues. Which of the remaining HCs of PPG have a role in nestmate recognition? Those which are in the same proportion in the PPG and on the cuticle may be good candidates. *n*-Alkanes and ext-MeA being discarded we have recalculated the mean percentages of the other HCs. Statistical comparison between cuticle and PPG HCs then showed that six compounds were not significantly different ($P > 0.05$): 15-,13-,11-,7-MeC29 (cuticle: 0.43 and PPG: 0.14%), 15-,13-,11-MeC31 (0.25 and 0.17%), Xi-MeC37:1 (1.72 and 2.85%), Xi-MeC39:1 (1.35 and 1.34%), 19-,17-,15-,14-,13-MeC39 (4.27 and 2.76%) and 13,19-diMeC39 (10.43 and 8.12%) (Annexe 3b). Three of them are prevalent (peaks 40, 49 and 50) and all of them are *internal* mono-, dimethylalkanes (peaks 13, 25, 49 and 50) or monomethylalkenes (peaks 40 and 48). These observations suggest that the quantities of these HCs are precisely controlled in order to obtain identical pattern between PPG and cuticle for each worker. Thus, our data show that in spite of the decrease of some HCs in the PPG, six compounds (three of them are prevalent) are statistically not different. Therefore, if PPG HCs have the same behavioural role as cuticle HCs we can assume that those HCs play an important role in nestmate recognition. It is well known that internal methyl-branching as well as unsaturation markedly lower the Tms of HCs (Gibbs, 1998b) and hence increase their fluidity. This is quite in agreement with a role in chemical communication. Behavioural tests on different classes of *Pachycondyla villosa* HCs to determine which HCs are involved in nestmate recognition are reported in another paper (Lucas *et al.*, submitted).

On the cuticle, the two important groups of HCs (waterproofing and insect communication) are precariously balanced. Indeed, HCs involved in waterproofing have a

high T_m and so are less volatile. In contrast, HCs involved in insect communication must be more volatile. A mixture of these two kinds of components may balance the general T_m of the cuticle. Depending on the environment or life cycle, waterproofing or chemical communication is favoured. Thus, during the sexual maturity of *Musca domestica* females, a significant decline in T_m occurs because of a high secretion of (Z)-9-tricosene (Gibbs & Pomonis, 1995). PPG can be considered as an evolutive answer to the problem raised by the coexistence of the two different types of cuticular HCs. While resistance against high temperatures may be a relatively slow process, colonial odour must be rapidly restored for nestmate recognition to avoid aggressive and even fatal reactions. From this point of view, PPG constitutes a reservoir for a great quantity of rapidly accessible recognition cues.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to C. Company for her commentaries on English. We thank J.L. Durand for his helpful remarks on statistical analysis. This research was supported by a CAPES COFECUB grant (944-188) and by a scientific expedition permit from the Brazilian Ministry of Science and Technology (028/00).

REFERENCES

- Blacklock BJ, Ryan RO. 1994.** Hemolymph lipid transport. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**: 855-873.
- Blomquist GJ, Jackson LL. 1973.** Incorporation of labelled dietary *n*-alkanes into cuticular lipids of the grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Insect Physiology* **19**: 1639-1647.
- Blomquist GJ, Nelson DR, De Renobales M. 1987.** Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **6**: 227-265.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987.** Improved staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Capurro MdL, Bianchi AGd, Marinotti O. 1994.** *Aedes aegypti* lipophorin. *Comparative Biochemistry and Physiology* **108B**: 35-39.
- Chase J, Touhara K, Prestwich GD, Schal C, Blomquist GJ. 1992.** Biosynthesis and endocrine control of the production of the German cockroach sex pheromone 3,11-dimethylnonacosan-2-one. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 6050-6054.
- Chino H. 1985.** Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. In: Kerkut GA and Gilbert LI, eds. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. New York: Pergamon Press. 115-135.
- Chino H, Kitazawa K. 1981.** Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects. *Journal of Lipid Research* **22**: 1042-1052.
- Cuvillier-Hot V, Gadagkar R, Peeters C, Cobb M. 2002.** Regulation of reproduction in a queenless ant: aggression, pheromones and reduction in conflict. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* **269**: 1295-1300.
- Dahbi A, Jaisson P, Lenoir A, Hefetz A. 1998.** Comment les fourmis partagent leur odeur. *La recherche* **314**: 32-34.
- Dettner K, Liepert C. 1994.** Chemical Mimicry and Camouflage. *Annual Review of Entomology* **39**: 129-154.
- Eigenbrode SD, Espelie KE. 1995.** Effects of Plant Epicuticular Lipids on Insect Herbivores. *Annual Review of Entomology* **40**: 171-194.

- Ferveur J-F, Jallon J-M. 1996.** Genetic control of male cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research* **67**: 211-218.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**: 497-509.
- Gibbs AG. 1998a.** The role of lipid physical properties in lipid barriers. *American Zoologist* **38**: 268-279.
- Gibbs AG. 1998b.** Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist* **38**: 471-482.
- Gibbs AG, Mousseau TA. 1994.** Thermal acclimation and genetic variation in cuticular lipids of the lesser migratory grasshopper (*Melanoplus sanguinipes*) : Effects of lipid composition on biophysical properties. *Physiol. Zool.* **67**: 1523-1543.
- Gibbs AG, Pomonis JG. 1995.** Physical properties of insect cuticular hydrocarbons : the effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry* **112**: 243-249.
- Gondim KC, Oliveira PL, Coelho HSL, Masuda H. 1989.** Lipophorin from *Rhodnius prolixus*: purification and partial characterization. *Insect Biochemistry* **19**: 153-161.
- Gu X, Quilici D, Juarez P, Blomquist GJ, Schal C. 1995.** Biosynthesis of hydrocarbons and contact sex pheromone and their transport by lipophorin in females of the German cockroach *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology* **41**: 257-267.
- Hefetz A, Soroker V, Dahbi A, Malherbe MC, Fresneau D. 2001.** The front basitarsal brush in *Pachycondyla apicalis* and its role in hydrocarbon circulation. *Chemoecology* **11**: 17-24.
- Heinze J, Stengl B, Sledge MF. 2002.** Worker rank, reproductive status and cuticular hydrocarbon signature in the ant, *Pachycondyla cf. inversa*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **52**: 59-65.
- Howard RW. 1993.** Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: Stanley-Hammelson DW and Nelson DR, eds. *Insect lipids : Chemistry, biodiversity and biology*. Nebraska: University of Nebraska Press. 179-226.
- Kaib M, Eisermann B, Schoeters E, Billen J, Franke S, Francke W. 2000.** Task-related variation of postpharyngeal and cuticular hydrocarbon compositions in the ant *Myrmicaria eumenoides*. *Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology* **186**: 939-948.
- Kanost MR, Kawooya JK, Law JH, Ryan RO, Van Heusden MC, Zeigler R. 1990.** Insect hemolymph proteins. *Advances in Insect Physiology* **22**: 299-396.

- Katagiri C, De Kort S. 1991.** Characterization of Colorado potato beetle lipophorin: a hydrocarbon-rich diacylglycerol-poor lipophorin. *Comparative Biochemistry and Physiology* **100B**: 149-152.
- Katase H, Chino H. 1982.** Transport of hydrocarbons by the lipophorin of insect hemolymph. *Biochimica Biophysica Acta* **710**: 341-348.
- Katase H, Chino H. 1984.** Transport of hydrocarbons by haemolymph lipophorin in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry* **14**: 1-6.
- Kim BS, Kim HR. 1994.** Purification and characteristics of lipophorin in *Bombyx mori*. *Korean Journal of Zoology* **37**: 76-87.
- King LE, Tobe SS. 1992.** The structure of a juvenile hormone-binding lipophorin from the hemolymph of *Diploptera punctata*. *Insect Biochemistry* **23**: 817-827.
- Laëmmli OK. 1970.** Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Lahav S, Soroker V, Hefetz A, Vander Meer RK. 1999.** Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* **86**: 246-249.
- Law JH, Ribeiro JM, Wells MA. 1992.** Biochemical insights derived from insect diversity. *Annual Review of Biochemistry* **61**: 87-111.
- Lenoir A, Fresneau D, Errard C, Hefetz A. 1999.** Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. In: Detrain C, Deneubourg JL and Pasteels JM, eds. *Information processing in social insects*. Berlin: Birkhauser verlag. 219-237.
- Lucas C, Fresneau D, Kolmer K, Heinze J, Delabie JHC, Pho DB. 2002.** A multidisciplinary approach to discriminating different taxa in the species complex *Pachycondyla villosa* (Formicidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **75**: 249-259.
- Lucas C, Pho DB, Jallon JM, Fresneau D. submitted.** Specific recognition behaviours elicited by cuticular hydrocarbons in ants: a new ethological test. *Animal Behaviour*.
- McCarthy ED, Han J, Calvin M. 1968.** Hydrogen atom transfer in mass spectrometric fragmentation patterns of saturated aliphatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry* **40**: 1475-1480.
- Meskali M, Bonavita-Cougourdan A, Provost E, Bagnères AG, Dusticier G, Clement JL. 1995.** Mechanism underlying cuticular hydrocarbon homogeneity in the ant *Camponotus vagus* (Scop.)(Hymenoptera: Formicidae): Role of postpharyngeal glands. *J. Chem. Ecol.* **21**: 1127-1148.

- Monnin T, Malosse C, Peeters C. 1998.** Solid-phase microextraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *J. Chem. Ecol.* **24**: 473-490.
- Nelson DR. 1978.** Long-chain methyl-branched hydrocarbons: occurrence, biosynthesis and function. *Advances in Insect Physiology* **13**: 1-33.
- Nelson DR, Sukkestad DR, Terranova AC. 1971.** Hydrocarbon composition of the integument, fat body, hemolymph, and, diet of the tobacco hornworm. *Life Sciences* **10**: 411-419.
- Nelson DR, Sukkestad DR, Zaylskie RG. 1972.** Mass spectra of methyl-branched hydrocarbons from eggs of the tobacco hornworm. *Journal of Lipid Research* **13**: 413-421.
- Noble-Nesbitt J. 1991.** Cuticle permeability and its control. In: Binnington K and Retnakaran A, eds. *Physiology of the insect epidermis*. East Melbourne: CSIRO Pubs. 252-283.
- Pattnaik NM, Mundall EC, Trambusti BG, Law JH, Kezdy FJ. 1979.** Isolation and characterization of a larval lipoprotein from the hemolymph of *Manduca sexta*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **63B**: 469-476.
- Pennanec'h M, Pho DB, Pechine JM, Jallon JM. 1995.** Insect hydrocarbons: analysis, structures and functions. *EPPO Bulletin* **25**: 343-348.
- Pho DB, Pennanec'h M, Jallon JM. 1996.** Purification of adult *Drosophila melanogaster* lipophorin and its role in hydrocarbon transport. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **31**: 289-303.
- Pomonis JG, Fatland CL, Nelson DR, Zaylskie RG. 1978.** Insect hydrocarbons. Corroboration of structure by synthesis and mass spectrometry of mono- and dimethylalkanes. *J. Chem. Ecol.* **4**: 27-39.
- Pomonis JG, Nelson DR, Fatland CL. 1980.** Insect hydrocarbons. 2. Mass spectra of dimethylalkanes and the effect of the number of methylene units between methyl groups on fragmentation. *J. Chem. Ecol.* **6**: 965-972.
- Rouault J, Capy P, Jallon JM. 2000.** Variations of male cuticular hydrocarbons with geoclimatic variables: an adaptative mechanism in *Drosophila melanogaster* ? *Genetica* **110**: 117-130.
- Schal C, Sevala V, Carde RT. 1998a.** Novel and highly specific transport of a volatile sex pheromone by hemolymph lipophorin in moths. *Naturwissenschaften* **85**: 339-342.

- Schal C, Sevala VL, Young HP, Bachmann JAS. 1998b.** Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: Cuticle and ovary as target tissues. *American Zoologist* **38**: 382-393.
- Sevala V, Shu SQ, Ramaswamy SB, Schal C. 1999.** Lipophorin of female *Blattella germanica* (L.): characterization and relation to hemolymph titers of juvenile hormone and hydrocarbons. *Journal of Insect Physiology* **45**: 431-441.
- Shapiro JP, Keim PS, Law JH. 1984.** Structural studies on lipophorin, an insect lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **259**: 3680-3685.
- Singer TL. 1998.** Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *American Zoologist* **38**: 394-405.
- Small DM. 1986.** The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids *Handbook of lipid research*. New York: Plenum Press.
- Soroker V, Lucas C, Simon T, Fresneau D, Durand JL, Hefetz A. submitted.** The significance of within-group hydrocarbons distribution for workers of *Pachycondyla apicalis*. *Insectes Sociaux*.
- Soroker V, Vienne C, Hefetz A. 1995.** Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Chem. Ecol.* **21**: 365-378.
- Soroker V, Vienne C, Hefetz A, Nowbahari E. 1994.** The postpharyngeal gland as a "Gestalt" organ for nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*. *Naturwissenschaften* **81**: 510-513.
- Soulages JL, Wells MA. 1994.** Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Advances in Protein Chemistry* **45**: 371-415.
- Van der Horst DJ. 1990.** Lipid transport function of lipoproteins in flying insects. *Biochimica Biophysica Acta* **1047**: 195-211.
- Van der Horst DJ, Weers PMM, Van Marrowjik WJA. 1993.** Lipoproteins and lipid transport. In: Stanley-Samuelson DW and Nelson DR, eds. *Insect lipids: chemistry, biochemistry, and biology*. Lincoln: University of Nebraska Press. 1-24.
- Vander Meer RK, Glancey BM, Lofgren CS. 1982.** Biochemical changes in the crop, oesophagus and postpharyngeal gland of colony-founding red imported fire ant queens (*Solenopsis invicta*). *Insect Biochemistry* **12**: 123-127.
- Vander Meer RK, Morel L. 1998.** Nestmate recognition in ants. In: Vander Meer RK, Breed M, Winston M and Espelie KE, eds. *Pheromone communication in social insects*. Boulder, CO. 368 p.: Westview Press. 79-103.

- Wagner D, Brown MJF, Broun P, Cuevas W, Moses LE, Chao DL, Gordon DM. 1998.** Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *J. Chem. Ecol.* **24**: 2021-2037.
- Wagner D, Tissot M, Gordon D. 2001.** Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *J. Chem. Ecol.* **27**: 1805-1819.
- Young HP, Bachmann JAS, Sevala V, Schal C. 1999.** Site of synthesis, tissue distribution, and lipophorin transport of hydrocarbons in *Blattella germanica* (L.) nymphs. *Journal of Insect Physiology* **45**: 305-315.
- Young HP, Larabee JK, Gibbs AG, Schal C. 2000.** Relationship between tissue-specific hydrocarbon profiles and lipid melting temperatures in the cockroach *Blattella germanica*. *J. Chem. Ecol.* **26**: 1245-1263.

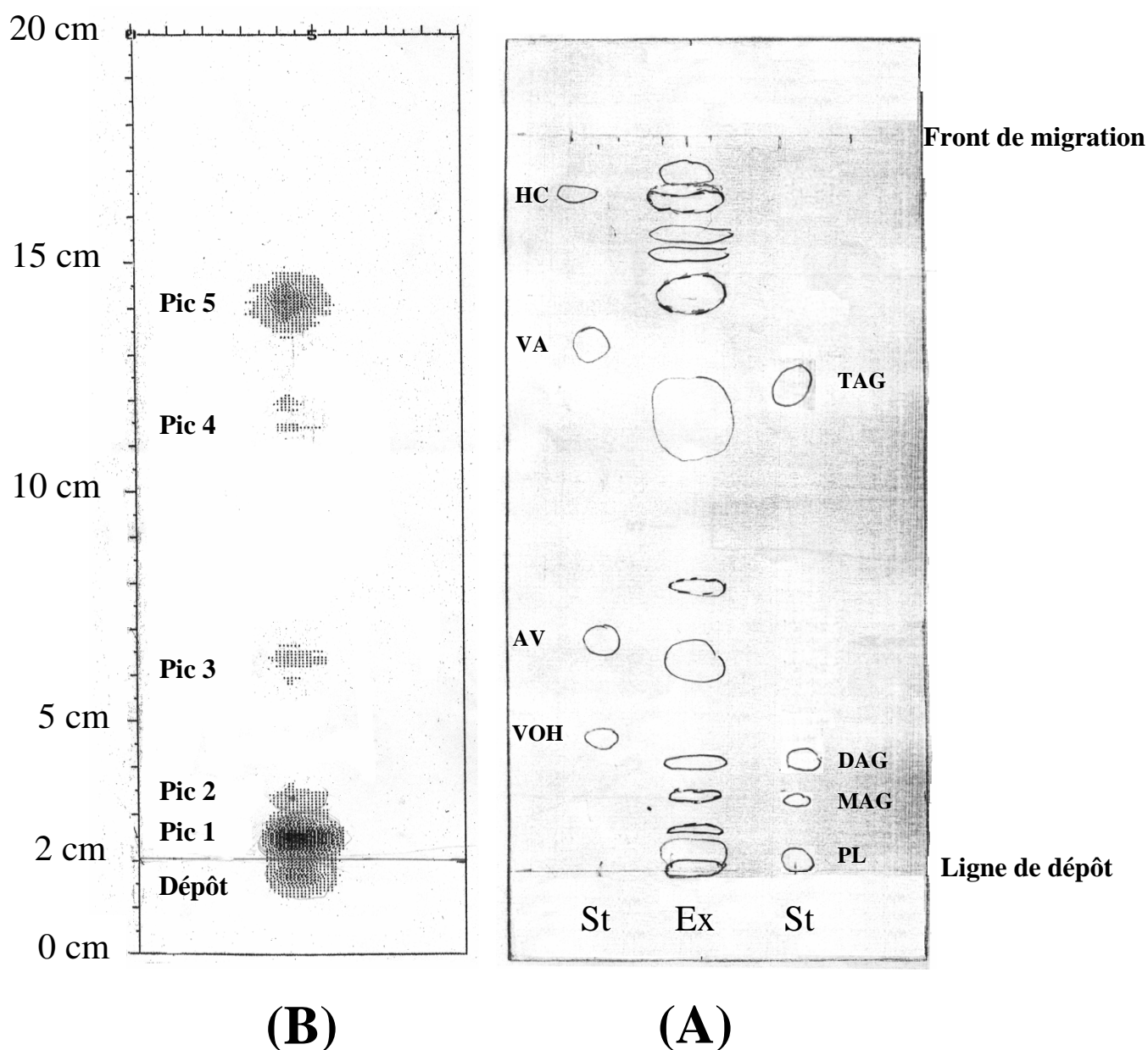


Figure 3a.1: Chromatographie sur couche mince de l'expérience II. **(A)** Plaque révélée par vapeur d'iode. Ex: extrait lipidique de PPG; St: Standards (VOH: vaccénol, AV: acide vaccénique, VA: vaccényl acétate, HC: hydrocarbure, PL: phospholipide, MAG: monoacylglycérol, DAG: diacylglycérol, TAG: triacylglycérol). **(B)** Radiodétection de la même plaque.

Annexe 3a

Capacité de biosynthèse de la PPG

Nous avons entrepris des expériences d'incubation d'homogénats de PPG avec différents précurseurs radioactifs pour déterminer la capacité de biosynthèse de cette glande chez *P. inversa*. Pour chaque expérience, 20 PPGs ont été disséquées (la glande prépharyngienne est enlevée) et déposées dans une solution physiologique à 4°C (7,5 g/l NaCl, 0,35 g/l KCl) puis broyées et incubées avec une solution à 0,1 mM de tampon phosphate (pH 7) contenant: 5 mM sucrose, 2mM DTT, 100 mM acide ascorbique, 2 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 5mM benzamidine, 1mM PMSF, leupeptine, pepstatine et aprotinine à 20 µg/ml, 1,6 mM NADPH, 0,8 mM CoA, 1 mM ATP et 7 mM MgCl₂. Les incubations, dans un volume de 1 ml, ont été agitées à 27°C avec des durées variables après addition de différents précurseurs radioactifs:

Tableau 3a.1: Substrats utilisés et durées d'incubation pour les expériences I à V
(+: Présence, - : Absence).

Substrats/Expérience	I	II	III	IV	V
¹⁴ C-Acétate 1 µCi (57 mCi/mmol)	+	+	+	+	-
Propionate 1 mM	-	-	-	+	-
³ H-Leucine 0,5 µCi/µmol	-	-	-	-	+
Durée d'incubation (heure)	5	16	40	40	40

Après incubation, on extrait les lipides en agitant l'homogénat avec 4 ml d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1 v/v) pendant 1 heure. Ensuite, les deux phases sont séparées par centrifugation à 5000g, 10 min à 20°C. La phase chloroformique contenant les lipides est récupérée par aspiration par le fond avec une microseringue. Elle est ensuite évaporée sous un flux d'azote et le résidu est redissout dans 100 µl de chloroforme. Les HCs de cette solution chloroformique sont séparés des autres lipides par chromatographie sur couche mince (TLC) de gel de silice (Silica Gel 60 F-254) dans un solvant hexane/diethylether/acide acétique (80/20/2, v/v). Les lipides témoins sont chromatographiés en parallèle. La révélation se fait par coloration à la vapeur d'iode. Les taches radioactives sont détectées et quantifiées avec un analyseur linéaire de radioactivité (Berthold) (Fig. 3a.1).

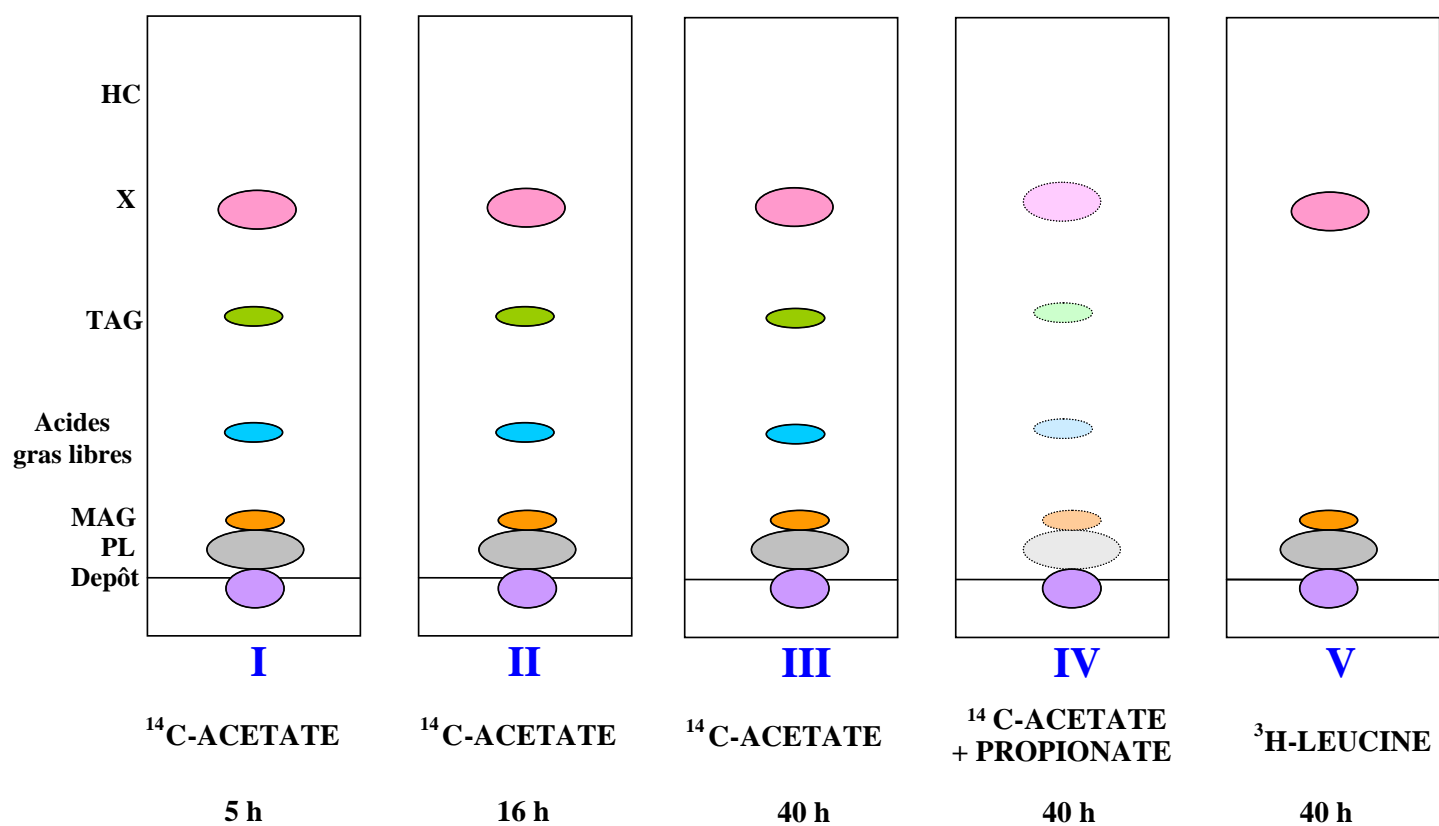


Figure 3a.2: Schémas des radiographies des différentes expériences.

Tableau 3a.2: Pourcentages d'incorporation de la radioactivité; tr: trace (< 0,1%).

Expériences	I	II	III	IV	V	Rf Moy.	Rf E.S.
Dépôt (en %)	55,05	13,36	56,24	100,00	94,06	0,08	0,003
Pic 1	14,16	44,52	3,42	tr	2,21	0,14	0,01
Pic 2	4,17	4,36	1,04	tr	3,73	0,21	0,01
Pic 3	2,40	7,78	10,71	tr	/	0,34	0,03
Pic 4	11,98	7,61	12,16	tr	/	0,56	0,01
Pic 5	12,25	22,38	16,42	tr	0,34	0,72	0,01
Totale (cpm)	22206,59	7904,22	19638,18	21141,61	11795,78	/	/

Aucune biosynthèse d'HC n'a été détectée dans les 5 conditions expérimentales testées (Tab. 3a.2, Fig. 3a.2). Par contre d'autres pics radioactifs sont visibles. Par comparaison directe avec les témoins, le pic 1 pourrait correspondre aux phospholipides (PL), le pic 2 aux monoacylglycérols (MAG), le pic 3 à un acide gras, le pic 4 aux triacylglycérols (TAG). Cependant, une identification précise nécessiterait d'autres techniques d'analyse. Enfin le pic 5 (X) qui se retrouve sur toutes les plaques possède un R_f moyen de 0,72 et ne correspond à aucun de nos témoins.

Le propionate intervient dans la chaîne de biosynthèse des HCs. Dans l'expérience IV, nous avons ajouté du propionate froid en plus de l'acétate radioactif, afin d'éviter que le propionate soit un élément limitant de la biosynthèse. Aucun pic d'HC n'a été détecté et les pics 2 à 5 ont présenté une radioactivité très faible. La radioactivité de l'acétate a probablement été diluée par la formation d'acétate froid provenant de la dégradation du propionate.

Annexe 3b

Comparaison des profils hydrocarbonés cuticule/PPG

(complément)

La comparaison des profils hydrocarbonés a été faite aussi sur les 2 autres espèces Pi et Ps. Ces résultats confirment ceux de l'article 3 sur l'espèce de Pv. Il n'y a pas de différence qualitative entre les HCs de la cuticule et ceux de la PPG (Tab. 3b.1A, B). Par contre, de fortes différences quantitatives existent (Fig. 3b.1A, B) et portent principalement sur les *n*-alcanes et les MeA-Ext. Les analyses en composantes principales (ACP) basées sur les pourcentages des HCs majoritaires (moyenne > 2%) de la cuticule et de la PPG montrent deux nuages séparés (Fig. 3b.1A, B). Les deux premiers facteurs F1 et F2 représentent 33 et 27% de la variance totale pour Pi, tandis que pour Ps, ils représentent 40 et 16%. Dans le cas de Ps, les profils hydrocarbonés de la PPG sont positivement corrélés au facteur 1 tandis que ceux de la cuticule sont négativement corrélés à cet axe. En ce qui concerne Pi, les 2 nuages (cuticule et PPG) semblent plus dispersés que pour Pv ou Ps. En réalité, les profils hydrocarbonés de la PPG de Pi ont tendance à se rassembler en 3 "sous nuages" représentant les 3 colonies, visibles chez cette espèce dans le plan F1/F2.

Les pourcentages cumulés des classes d'HCs confirment la différence entre la PPG et la cuticule. En effet, tout comme Pv, les *n*-alcanes et les MeA-Ext s'avèrent être en plus faible quantité dans la PPG que dans la cuticule ($P < 0,05$) (Fig. 3b.2A, B). Chez Pi, entre la cuticule et la PPG, les *n*-alcanes passent de 35,82 à 3,75 % et les MeA-Ext de 21,27 à 13,22 %. Chez Ps, les *n*-alcanes passent de 20,65 à 5,29 % et les MeA-Ext de 34,66 à 18,60 %. Soit une diminution d'environ 12 à 32 % de ces deux classes d'HC. Selon la théorie de la reconnaissance coloniale, les HCs qui y sont impliqués sont présents en proportions similaires (que nous nommerons "stables") chez tous les individus appartenant à la même colonie. C'est la proportion de chaque HC (ou d'une partie de ces HCs) qui est reconnue comme marqueur colonial. De plus, il a été démontré que les HCs de la PPG et ceux de la cuticule possèdent le même rôle comportemental dans la reconnaissance des apparentés. Or, l'article 3 nous amène à faire l'hypothèse que les *n*-alcanes et les MeA-Ext ne participent pas à la reconnaissance des apparentés. Donc selon cette hypothèse, quels sont les HCs "stables" entre la cuticule et la PPG si l'on recalcule les pourcentages des HCs en éliminant les *n*-alcanes et les MeA-Ext? En d'autres termes quels sont les HCs (parmi ceux ayant un rôle dans la reconnaissance des

apparentés) qui sont les plus susceptibles de porter l'information coloniale? Les figures 3b.3 comparent les pourcentages recalculés (sans les *n*-alcane et les MeA-Ext) des classes d'HCs chez les 3 espèces. Seuls les alcènes pour Pv et les diMeA+triMeA pour Pi s'avèrent significativement différents. Les autres classes d'HC s'avèrent non différentes (avec des E.S. petites) entre la cuticule et la PPG alors qu'elles sont différentes si les pourcentages ne sont pas recalculés. La comparaison au niveau de chaque HC avec les pourcentages recalculés (sans les *n*-alcane et les MeA-Ext) est montrée dans les Tableaux 3b.2. Les HCs "stables" qui ressortent des analyses statistiques de comparaison de moyennes comme non significativement différents y sont surlignés en jaune. On constate qu'en général une partie des HCs "stables" sont en proportion majoritaire, mais cela n'est pas toujours le cas. Cette liste d'HCs "stables" regroupe donc les HCs les plus caractéristiques de chaque espèce, mais qu'en est-il au niveau colonial?

Selon Breed (1998) plusieurs facteurs sont requis pour qu'une molécule soit considérée comme étant active dans la reconnaissance coloniale. En particulier, cette molécule doit être en quantités variables d'une colonie à l'autre. Les tableaux 3b.3, 4 et 5 montrent les résultats de la comparaison statistique des pourcentages recalculés pour 9 colonies appartenant aux 3 espèces. Pour plus de clarté, chaque colonie est traitée dans un tableau séparé. Les HCs "stables" entre cuticule et PPG à l'intérieur de la colonie sont représentés en jaune dans chaque tableau. Cette liste d'HCs "stables" regroupe donc les HCs les plus caractéristiques de chaque colonie. Pour distinguer dans cette liste quels HCs sont en quantités variables d'une colonie à l'autre, nous avons comparé les moyennes recalculées des HCs de la PPG de chaque colonie avec celles des autres colonies. Ces moyennes sont en rouge lorsqu'elles sont significativement différentes entre colonies. On constate alors que chaque colonie possède sa propre liste d'HCs "stables" et que certains de cette liste sont en pourcentages variables d'une colonie à l'autre. Ainsi, chez Pv3 (Tab. 3b.3A) l'HC numéro 42 est "stable" entre cuticule et PPG (autour de 50%), alors que son pourcentage est statistiquement différent chez Pv6. La combinaison de ces deux caractéristiques désigne donc les HCs les plus susceptibles de participer de façon prépondérante à la reconnaissance coloniale selon notre hypothèse de base.

Les tableaux 3b.6 donnent à titre de comparaison, les pourcentages d'HCs de la cuticule par espèce, en détaillant chaque colonie et les tableaux 3b.7, ceux de la PPG. Les tableaux 3b.8 comparent les HCs majoritaires (moyenne >2%) de la cuticule à ceux de la PPG par espèces, en détaillant chaque colonie.

Tableau 3b.1A: Pourcentages des HCs de la cuticule et la PPG chez *P. inversa* classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=22).
HCS en gras : >2%; trace (tr) : <0.1%.

N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy.	E.S.	PPG Moy.	E.S.	N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy.	E.S.	PPG Moy.	E.S.
1	nC25	0,28	0,04	tr		29	8,14-diMeC28	tr		0,31	0,11
2	15-,13-,11-,9-MeC25	tr		tr		30	3-MeC28	0,40	0,04	0,14	0,03
3	7-MeC25	tr		tr		31	6,14-diMeC28	tr		tr	
4	3-MeC25	tr		tr		32	4,12-diMeC28	tr		tr	
5	nC26	0,54	0,03	tr		33	nC29:1	0,95	0,23	tr	
6	3,11-;3,9-diMeC25	tr		tr		34	nC29	9,18	1,48	2,12	0,45
7	13-,12-,10-,9-MeC26	0,16	0,05	tr		35	Xi-MeC29:1	7,03	1,44	12,24	2,85
8	6-MeC26	tr		tr		36	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	13,98	1,64	28,81	2,45
9	4-,2-MeC26	0,36	0,09	tr		37	5-MeC29	tr		tr	
10	3-MeC26	0,14	0,05	tr		38	diMeC29:1	0,67	0,31	2,79	1,04
11	nC27:1	1,06	0,20	tr		39	11,15-;9,15-;9,13-diMeC29	1,23	0,34	4,37	0,67
12	nC27	22,49	1,63	1,20	0,14	40	3-MeC29	5,97	0,72	5,51	0,68
13	3,11-;3,9-diMeC26	tr		tr		41	5,15-;5,11-diMeC29	tr		0,36	0,08
14	Xi-MeC27:1	0,48	0,12	0,80	0,12	42	nC30	tr		tr	
15	13-,11-,9-,7-MeC27	12,66	2,41	16,10	2,92	43	3,11-diMeC29	0,22	0,05	0,71	0,18
16	5-MeC27	tr		tr		44	Xi-MeC30:1	0,10	0,03	0,21	0,06
17	11,15-; 9,13-diMeC27	0,34	0,10	2,79	0,39	45	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	0,33	0,07	1,31	0,11
18	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	0,14	0,06	tr		46	Xi-MeC31:1	0,47	0,14	1,19	0,35
19	3-MeC27	12,84	1,42	6,84	1,14	47	15-,13-,11-MeC31	0,87	0,12	2,40	0,24
20	5,11-;5,9-diMeC27	tr		0,58	0,10	48	7-MeC31	tr		tr	
21	nC28:1	0,12	0,03	tr		49	11,19-;11,15-diMeC31	tr		0,17	0,10
22	nC28	3,25	0,31	0,26	0,06	50	13,17-diMeC31	tr		tr	
23	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27	0,76	0,17	1,93	0,46	51	9,21-diMeC31	tr		0,11	0,03
24	Xi-MeC28:1	0,16	0,04	0,45	0,06	52	7,19-diMeC31	tr		0,11	0,03
25	14-,13-,12-,11-,10-MeC28	1,50	0,11	3,12	0,11	53	7,15-diMeC31	tr		0,31	0,10
26	6-MeC28	0,11	0,02	0,32	0,03	54	13-,11-MeC33	tr		0,27	0,08
27	4-,2-MeC28	1,31	0,17	0,16	0,04	55	11,21-diMeC33	tr		0,17	0,05
28	5,19-;5,14-diMeC28	tr		0,85	0,17	56	13,23-diMeC35	tr		0,15	0,05

Tableau 3b.1B: Pourcentages des HCs de la cuticule et la PPG chez *P. subversa* classés par temps de rétention (moyenne ± e.s., n=16).
HCS en gras : >2%; trace (tr) : <0.1%.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.			Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC23	tr		tr		30	4,18-;4,16-;4,14-diMeC26	tr		0,43	0,02
2	11-,9-,7-MeC23	tr		0,11	0,02	31	nC27	1,00	0,11	0,35	0,12
3	5-MeC23	tr		0,12	0,02	32	3,15-;3,13-diMeC26	tr		tr	
4	3-MeC23	tr		tr		33	13-,11-,9-,7-MeC27	1,11	0,15	1,68	0,12
5	7,15-;5,17-;5,15-;5,11-diMeC23	tr		0,64	0,06	34	5-MeC27	0,19	0,03	0,25	0,02
6	nC24	0,17	0,05	0,12	0,02	35	3-MeC27	0,82	0,22	0,33	0,04
7	3,7-diMeC23	tr		tr		36	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	0,90	0,14	2,74	0,22
8	5,11,15-triMeC23	tr		tr		37	nC28	tr		tr	
9	5,9,17-triMeC23	tr		tr		38	3,19-;3,17-;3,15-diMeC27	tr		0,21	0,02
10	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24	tr		0,59	0,19	39	5,15,17-triMeC27	tr		tr	
11	6-,5-MeC24	tr		0,36	0,02	40	5,9,17-triMeC27	tr		tr	
12	4-,2-MeC24	tr		0,16	0,03	41	nC29	tr		0,11	0,05
13	3-MeC24	0,15	0,08	0,13	0,05	42	15-,13-,11-,7-MeC29	0,36	0,19	0,20	0,07
14	6,12-diMeC24	tr		tr		43	5-MeC29	tr		tr	
15	5,15-diMeC24	tr		0,33	0,01	44	3-MeC29	tr		tr	
16	nC25	18,24	2,00	4,64	0,79	45	5,17-diMeC29	tr		tr	
17	13-,11-,9-MeC25	6,51	0,58	12,29	0,51	46	15-,13-,11-,9-MeC31	tr		tr	
18	7-MeC25	3,79	0,26	4,59	0,24	47	11,19-diMeC31	tr		tr	
19	5-MeC25	11,47	0,50	8,91	0,42	48	7,19-diMeC31	tr		tr	
20	3-MeC25	21,43	1,50	7,75	0,88	49	11,21-diMeC33	tr		tr	
21	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25	29,81	1,75	43,26	1,29	50	12,22-diMeC34	tr		tr	
22	nC26	1,10	0,14	tr		51	15-,13-MeC35	tr		tr	
23	3,17-;3,15-;3,13-diMeC25	1,32	0,18	2,65	0,13	52	13,23-diMeC35	0,12	0,05	1,82	0,30
24	5,13,17-triMeC25	0,43	0,10	1,21	0,08	53	13,23-diMeC36	tr		tr	
25	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	0,46	0,07	0,71	0,04	54	13-MeC37	tr		tr	
26	6-,5-MeC26	0,24	0,04	0,40	0,02	55	13,25-;15,23-diMeC37	0,14	0,05	1,17	0,24
27	4-,2-MeC26	tr		tr		56	13,25-;15,25-diMeC38	tr		tr	
28	3-MeC26	tr		tr		57	13,25-;13,23-diMeC39	tr		tr	
29	6,18-;6,14-;5,17-diMeC26	0,21	0,03	0,82	0,03						

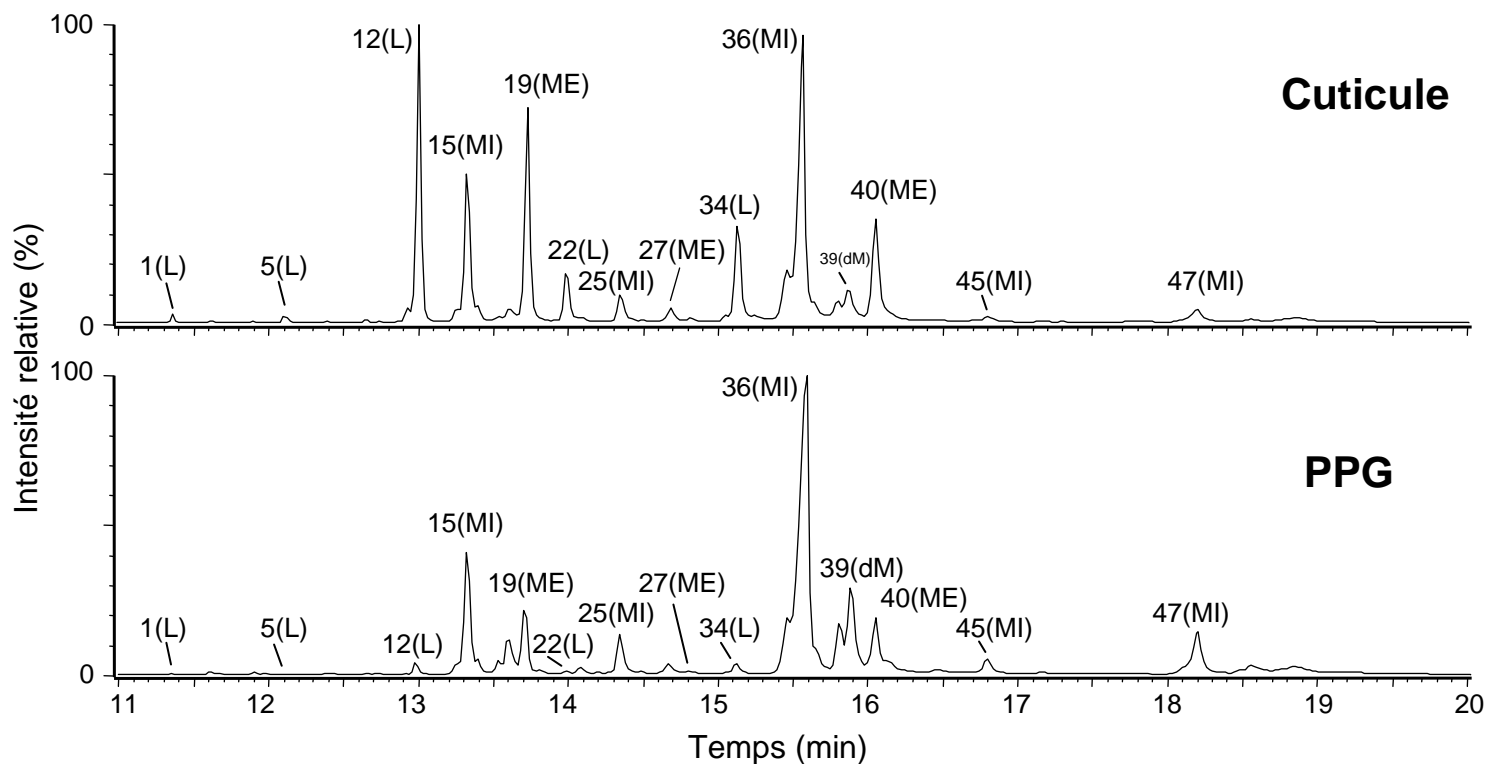


Figure 3b.1A: Chromatogrammes des HCs de la cuticule et de la PPG de la même ouvrière de *P. inversa*. Les numéros correspondent à la liste des HCs du tableau 3b.1A. L: *n*-alcane; ME: monométhylalcane externe; MI: monométhylalcane interne; dM: diméthylalcane.

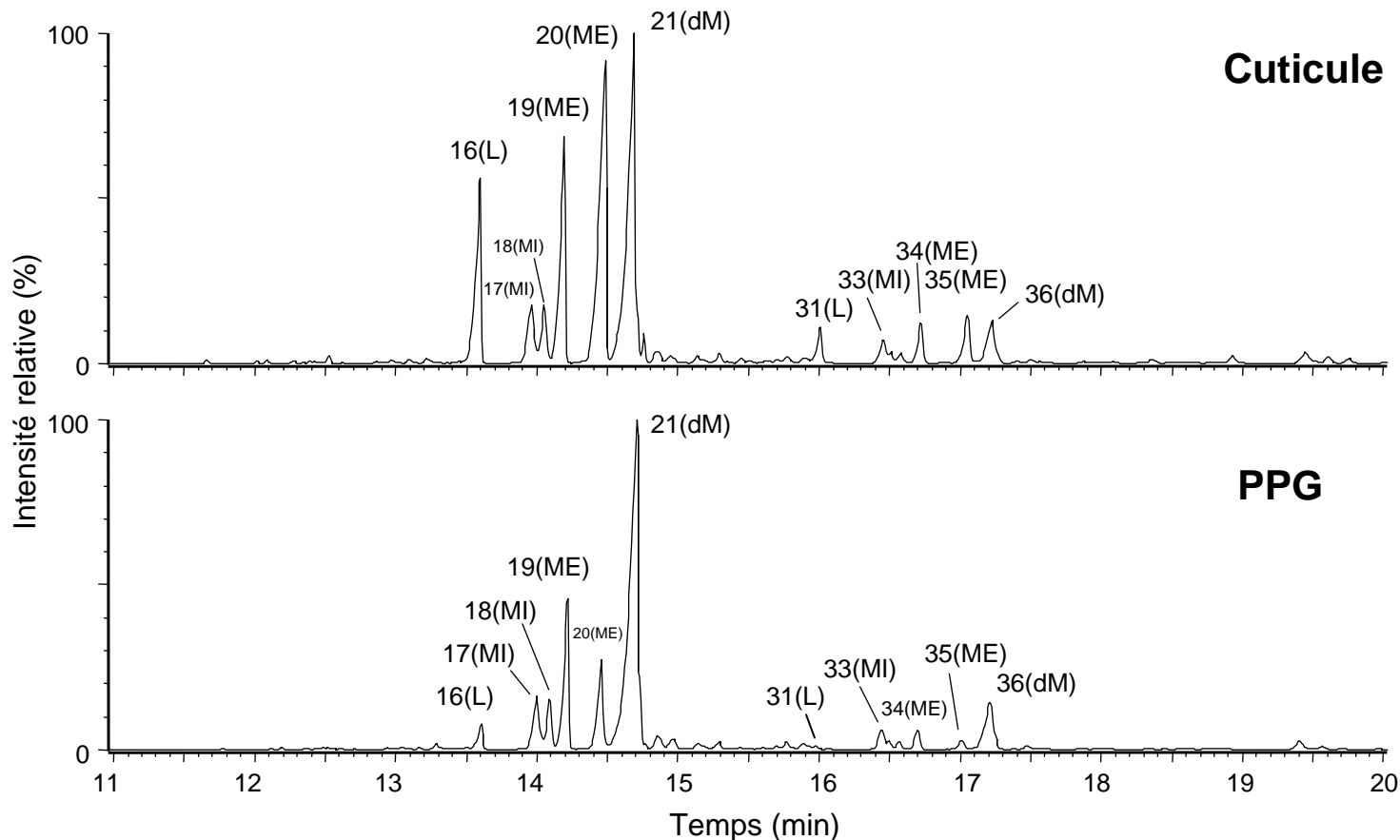


Figure 3b.1B: Chromatogrammes des HCs de la cuticule et de la PPG de la même ouvrière de *P. subversa*. Les numéros correspondent à la liste des HCs du tableau 3b.1B. L: *n*-alcane; ME: monométhylalcane externe; MI: monométhylalcane interne; dM: diméthylalcane.

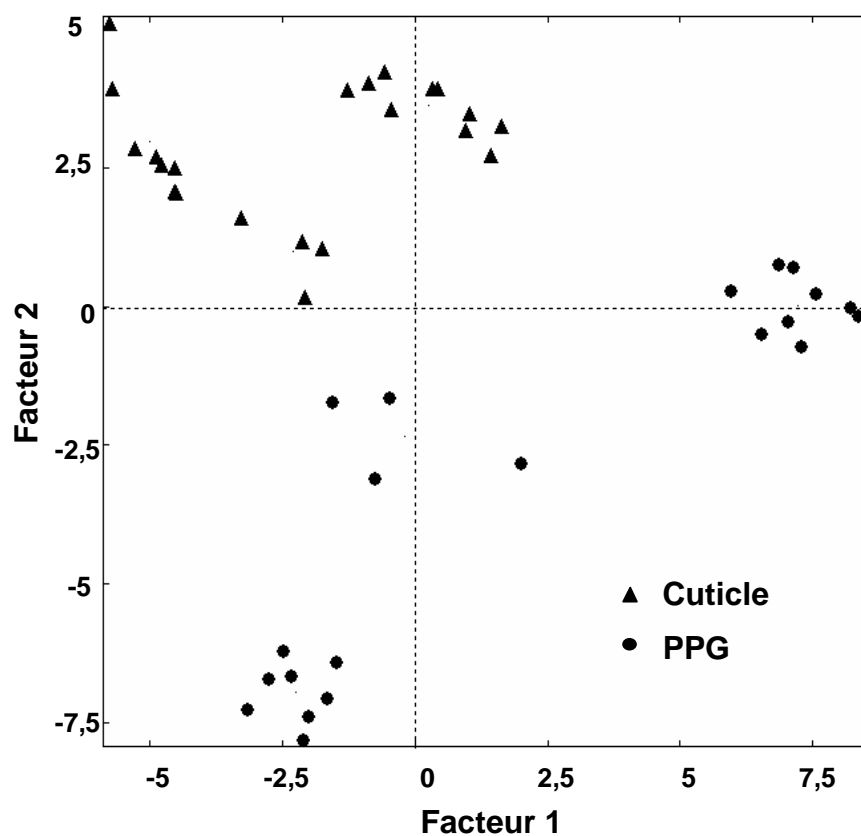


Figure 3b.2A: ACP des pourcentages des hydrocarbures de la cuticule et de la PPG chez *P. inversa*. Les deux premiers facteurs F1 et F2 représentent respectivement 33 et 27% de la variance totale. L'analyse porte sur des variables normalisées afin d'obtenir une meilleure comparaison.

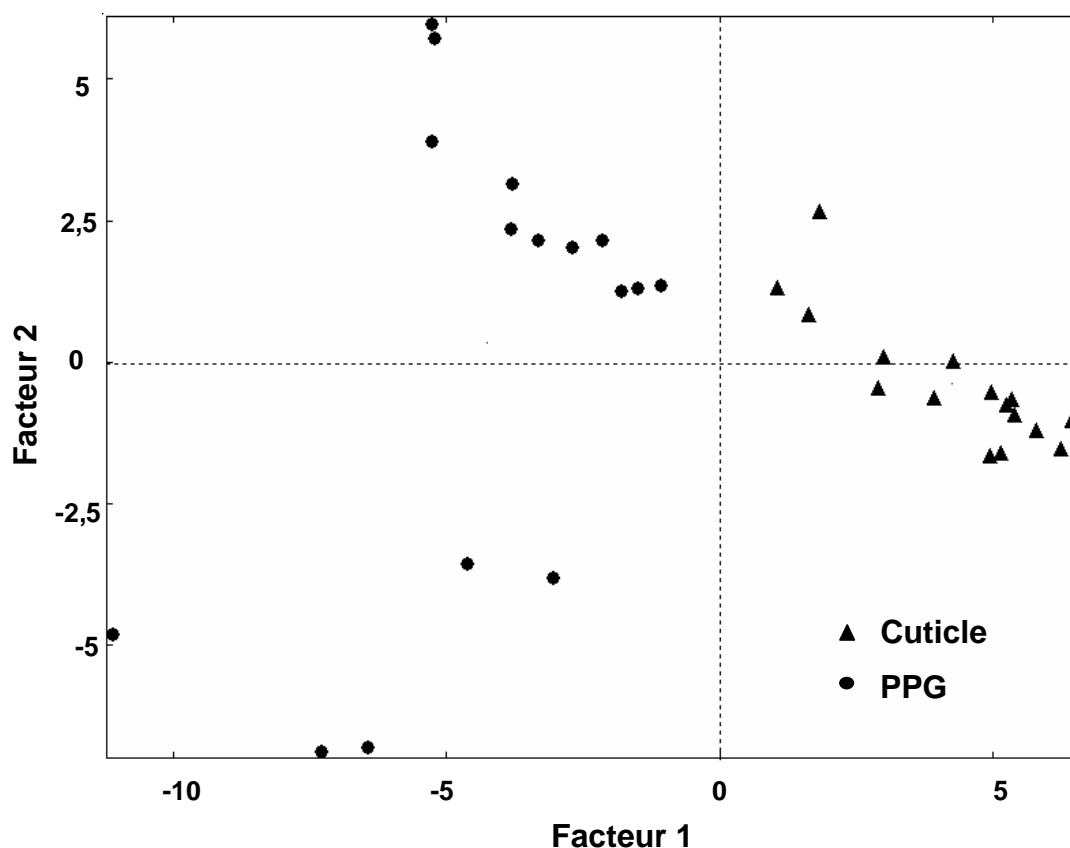


Figure 3b.2B: ACP des pourcentages des hydrocarbures de la cuticule et de la PPG chez *P. subversa*. Les deux premiers facteurs F1 et F2 représentent respectivement 40 et 16% de la variance totale. L'analyse porte sur des variables normalisées afin d'obtenir une meilleure comparaison.

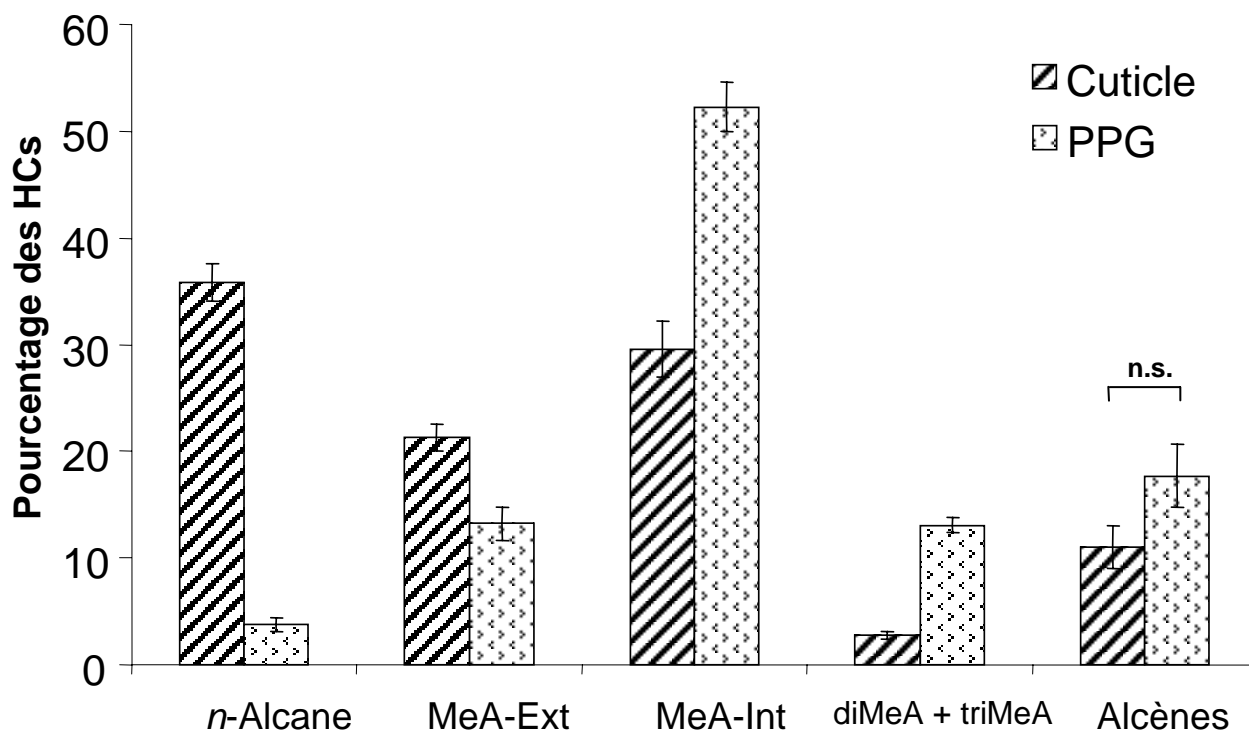


Figure 3b.3A: Pourcentages des HCs de la cuticule et la PPG chez *P. inversa* (Moy. \pm E.S.). Tout les valeurs sont significativement différentes ($P < 0.05$) entre la cuticule et la PPG ($n=22$) sauf pour le groupe marqué n.s. MeA-Ext: monomethylalcane externe; MeA-Int: monomethylalcane interne; diMeA: dimethylalcane; triMeA: trimethylalcane.

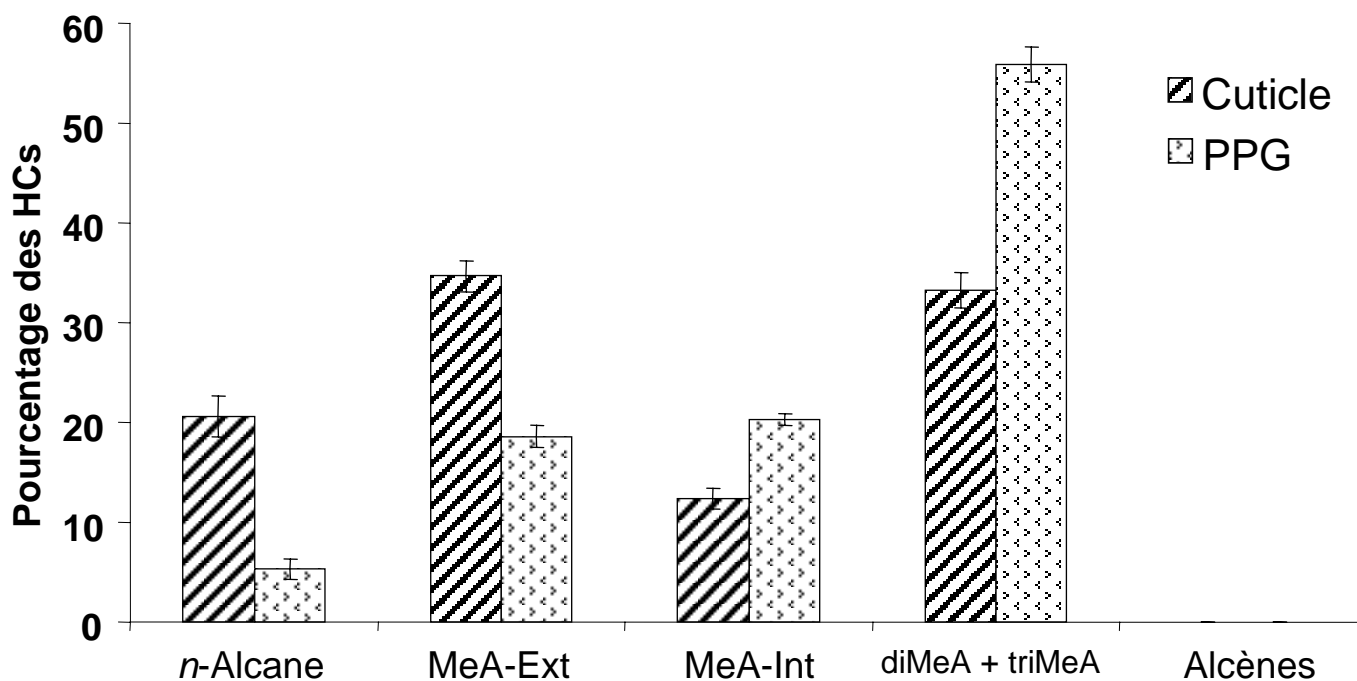


Figure 3b.3B: Pourcentages des HCs de la cuticule et la PPG chez *P. subversa* (Moy. \pm E.S.). Tout les valeurs sont significativement différentes ($P < 0.05$) entre la cuticule et la PPG ($n=16$). MeA-Ext: monomethylalcane externe; MeA-Int: monomethylalcane interne; diMeA: dimethylalcane; triMeA: trimethylalcane.

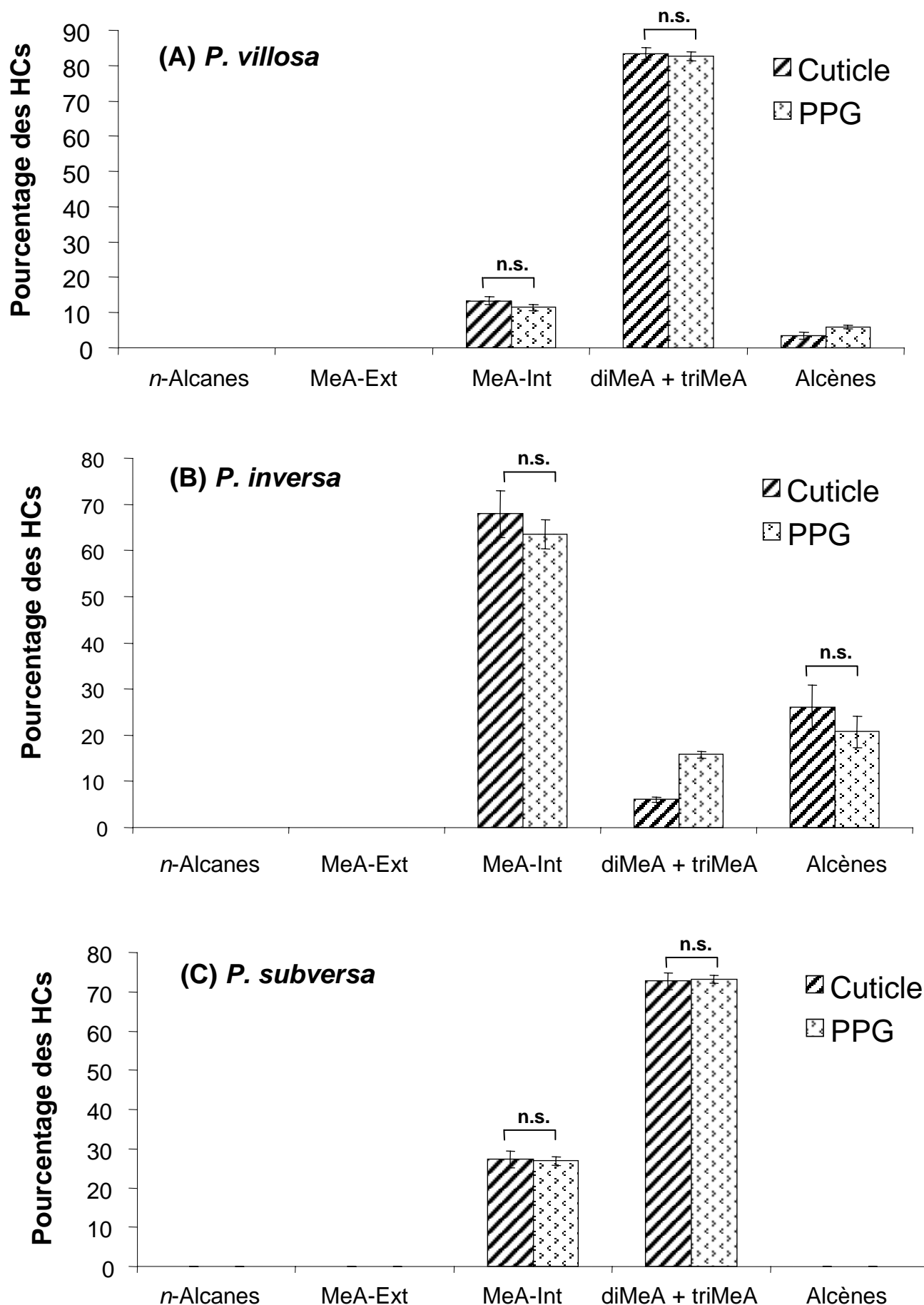


Figure 3b.4: Pourcentages recalculés (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la cuticule et de la PPG chez les 3 espèces (A, B et C) (Moy. \pm E.S.). Toutes les valeurs sont significativement différentes ($P < 0.05$) entre la cuticule et la PPG sauf pour les groupes marqués n.s. MeA-Ext: monométhylalcane externe; MeA-Int: monométhylalcane interne; diMeA: diméthylalcane; triMeA: triméthylalcane.

Tableau 3b.2A: Pourcentages recalculés (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la cuticule et la PPG chez *P. villosa*classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=18).**HCS en gras** : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy.	E.S.	PPG Moy.	E.S.	N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy.	E.S.	PPG Moy.	E.S.
1	nC26					33	Xi-MeC35:1	0,24	0,07	0,98	0,13
2	nC27					34	17-,15-,13-MeC35	0,72	0,16	2,10	0,15
3	13-,11-MeC27	tr		tr		35	Xi-diMeC35:1	tr		tr	
4	9-MeC27	tr		tr		36	13,19-;13,17-diMeC35	8,43	0,88	15,53	0,94
5	7-MeC27	tr		tr		37	Xi-MeC36:1	tr		0,16	0,02
6	5-MeC27					38	14-MeC36	tr		0,40	0,03
7	nC28					39	14,18-;12,16-diMeC36	0,80	0,17	2,67	0,11
8	2-MeC28					40	Xi-MeC37:1	1,72	0,48	2,85	0,24
9	X-nC29:1	tr		tr		41	19-,17-,15-,13-MeC37	7,33	0,54	4,53	0,43
10	X'-nC29:1	tr		tr		42	15,19-;13,17-diMeC37	62,56	3,37	50,35	1,99
11	2,15-;2,13-diMeC28	tr		tr		43	13,17,21-;11,17,25-triMeC37	tr		0,69	0,09
12	nC29					44	Xi-MeC38:1	tr		0,24	0,03
13	15-,13-,11-,7-MeC29	0,43	0,11	0,14	0,03	45	15-,14-,13-,12-,11-,7-MeC38	tr		0,35	0,03
14	13,17-diMeC29	tr		tr		46	14,18-;13,17-diMeC38	0,61	0,18	1,17	0,08
15	13,17-; 11,19-diMeC29	tr		0,03	0,01	47	12,16,20-triMeC38	tr		0,10	0,01
16	2-MeC29					48	Xi-MeC39:1	1,35	0,46	1,34	0,13
17	9,21-diMeC29	tr		tr		49	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	4,27	0,65	2,76	0,20
18	3-MeC29					50	13,19-diMeC39	10,43	1,17	8,12	0,28
19	nC30					51	13,17,21-triMeC39	tr		0,53	0,05
20	14-,13-,11-MeC30	tr		0,03	0,00	52	20-,14-MeC40	tr		0,11	0,01
21	8-,9-MeC30	tr		tr		53	14,20-diMeC40	tr		0,23	0,02
22	2-MeC30					54	Xi-MeC41:1	tr		0,18	0,03
23	2,15-;2,13-;2,11-diMeC31	tr		0,05	0,01	55	X'i-MeC41:1	tr		tr	
24	nC31					56	21-,19-,17-,15-,13-MeC41	0,21	0,09	0,48	0,05
25	15-,13-,11-MeC31	0,25	0,07	0,17	0,03	57	15,21-;13,21-;13,19-diMeC41	0,32	0,15	1,00	0,09
26	13,19-;11,19-diMeC31	tr		0,13	0,02	58	13,17,21-triMeC41	tr		0,17	0,02
27	3-MeC31					59	14,22-diMeC42	tr		tr	
28	Xi-MeC34:1	tr		0,05	0,01	60	13-MeC43	tr		0,15	0,02
29	17-,15-,13-,11-MeC33	0,06	0,02	0,18	0,02	61	13,19-;13,21-diMeC43	0,15	0,09	0,65	0,11
30	13,17-diMeC33	0,08	0,03	0,37	0,04	62	13,17,21-triMeC43	tr		tr	
31	17-,15-,14-,13-,12-MeC34	tr		0,07	0,01	63	13,21-diMeC45	tr		0,52	0,07
32	15,19-;13,17-diMeC34	tr		0,22	0,02						

Tableau 3b.2B: Pourcentages recalculés (sans les n-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la cuticule et la PPG chez ***P. inversa***

classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=22).

HCS en gras : >2%; trace (tr) : <0.1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.			Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC25					29	8,14-diMeC28	tr		0,41	0,15
2	15-,13-,11-,9-MeC25	tr		0,11	0,02	30	3-MeC28				
3	7-MeC25	tr		tr		31	6,14-diMeC28	tr		tr	
4	3-MeC25					32	4,12-diMeC28	tr		tr	
5	nC26					33	nC29:1	2,36	0,59		tr
6	3,11-;3,9-diMeC25	tr		tr		34	nC29				
7	13-,12-,10-,9-MeC26	0,40	0,12	tr		35	Xi-MeC29:1	16,54	3,31	14,40	3,31
8	6-MeC26					36	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	30,96	2,36	34,44	2,69
9	4-,2-MeC26					37	5-MeC29				
10	3-MeC26					38	Xi-diMeC29:1	1,36	0,54	3,18	1,15
11	nC27:1	2,68	0,54	tr		39	11,15-;9,15-;9,13-diMeC29	2,60	0,56	5,14	0,72
12	nC27					40	3-MeC29				
13	3,11-;3,9-diMeC26	tr		tr		41	5,15-;5,11-diMeC29	tr		0,42	0,10
14	Xi-MeC27:1	1,11	0,26	0,95	0,13	42	nC30				
15	13-,11-,9-,7-MeC27	30,30	5,92	20,21	3,84	43	3,11-diMeC29	0,53	0,14	0,84	0,22
16	5-MeC27					44	Xi-MeC30:1	0,23	0,06	0,24	0,07
17	11,15-; 9,13-diMeC27	0,71	0,19	3,44	0,50	45	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	0,73	0,15	1,56	0,12
18	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	0,36	0,13	tr		46	Xi-MeC31:1	1,11	0,31	1,40	0,40
19	3-MeC27					47	15-,13-,11-MeC31	1,94	0,22	2,88	0,27
20	5,11-;5,9-diMeC27	tr		0,73	0,13	48	7-MeC31	tr		tr	
21	nC28:1	0,30	0,08	tr		49	11,19-;11,15-diMeC31	tr		0,19	0,12
22	nC28					50	13,17-diMeC31	tr		tr	
23	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27	1,80	0,41	2,29	0,55	51	9,21-diMeC31	tr		0,13	0,04
24	Xi-MeC28:1	0,37	0,09	0,54	0,07	52	7,19-diMeC31	tr		0,13	0,04
25	14-,13-,12-,11-,10-MeC28	3,44	0,21	3,76	0,12	53	7,15-diMeC31	tr		0,41	0,13
26	6-MeC28					54	13-,11-MeC33	tr		0,34	0,10
27	4-,2-MeC28					55	11,21-diMeC33	tr		0,22	0,07
28	5,19-;5,14-diMeC28	tr		1,05	0,21	56	13,23-diMeC35	tr		0,19	0,06

Tableau 3b.2C: Pourcentages recalculés (sans les n-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la cuticule et la PPG chez *P. subversa*classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=16).**HCS en gras** : >2%; trace (tr) : <0.1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy.	E.S.	PPG Moy.	E.S.	N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy.	E.S.	PPG Moy.	E.S.
1	nC23					30	4,18-;4,16-;4,14-diMeC26	0,18	0,03	0,56	0,03
2	11-,9-,7-MeC23	tr		0,15	0,03	31	nC27				
3	5-MeC23					32	3,15-;3,13-diMeC26	tr		tr	
4	3-MeC23					33	13-,11-,9-,7-MeC27	2,38	0,27	2,22	0,17
5	7,15-;5,17-;5,15-;5,11-diMeC23	0,19	0,06	0,85	0,08	34	5-MeC27				
6	nC24					35	3-MeC27				
7	3,7-diMeC23	tr		tr		36	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	1,91	0,26	3,59	0,26
8	5,11,15-triMeC23	tr		tr		37	nC28				
9	5,9,17-triMeC23	tr		tr		38	3,19-;3,17-;3,15-diMeC27	0,15	0,03	0,28	0,02
10	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24	0,16	0,04	0,80	0,25	39	5,15,17-triMeC27	tr		tr	
11	6-,5-MeC24					40	5,9,17-triMeC27	tr		tr	
12	4-,2-MeC24					41	nC29				
13	3-MeC24					42	15-,13-,11-,7-MeC29	0,71	0,37	0,27	0,10
14	6,12-diMeC24	tr		tr		43	5-MeC29				
15	5,15-diMeC24	tr		0,44	0,02	44	3-MeC29				
16	nC25					45	5,17-diMeC29	tr		tr	
17	13-,11-,9-MeC25	14,52	1,34	16,23	0,73	46	15-,13-,11-,9-MeC31	tr		tr	
18	7-MeC25	8,46	0,58	6,09	0,37	47	11,19-diMeC31	tr		tr	
19	5-MeC25					48	7,19-diMeC31	tr		tr	
20	3-MeC25					49	11,21-diMeC33	tr		tr	
21	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25	65,37	2,57	56,75	0,91	50	12,22-diMeC34	tr		tr	
22	nC26					51	15-,13-MeC35	tr		tr	
23	3,17-;3,15-;3,13-diMeC25	2,87	0,33	3,48	0,14	52	13,23-diMeC35	0,27	0,10	2,34	0,38
24	5,13,17-triMeC25	0,93	0,20	1,59	0,09	53	13,23-diMeC36	tr		tr	
25	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	0,99	0,12	0,94	0,06	54	13-MeC37	tr		tr	
26	6-,5-MeC26					55	13,25-;15,23-diMeC37	0,29	0,09	1,49	0,29
27	4-,2-MeC26					56	13,25-;15,25-diMeC38	tr		tr	
28	3-MeC26					57	13,25-;13,23-diMeC39	tr		tr	
29	6,18-;6,14-;5,17-diMeC26	0,46	0,05	1,08	0,04						

Tableau 3b.3A: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la colonie **Pv3** de ***P. villosa*** classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=6).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HCs de la PPG de Pv3 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Pv6" et "PPG Pv21".

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pv6	PPG Pv21	N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pv6	PPG Pv21
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.			Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.
1	nC26							33	Xi-MeC35:1	0,50	0,13	0,83	0,21	1,64	0,64
2	nC27							34	17-,15-,13-MeC35	1,31	0,20	2,05	0,18	2,88	1,58
3	13-,11-MeC27	tr		tr		tr	tr	35	Xi-diMeC35:1	0,14	0,04	tr		tr	tr
4	9-MeC27	tr		tr		tr	tr	36	13,19-;13,17-diMeC35	10,16	1,65	15,90	2,49	17,74	13,62
5	7-MeC27	tr		tr		tr	tr	37	Xi-MeC36:1	tr		0,11	0,02	0,29	0,11
6	5-MeC27							38	14-MeC36	tr		0,33	0,02	0,57	0,35
7	nC28							39	14,18-;12,16-diMeC36	1,55	0,12	2,28	0,12	3,24	2,58
8	2-MeC28							40	Xi-MeC37:1	4,43	0,29	2,54	0,46	3,82	2,42
9	X-nC29:1	tr		tr		tr	tr	41	19-,17-,15-,13-MeC37	7,40	0,30	4,09	0,61	6,20	3,71
10	X'-nC29:1	tr		tr		tr	tr	42	15,19-;13,17-diMeC37	47,89	4,74	50,33	2,98	42,31	56,12
11	2,15-;2,13-diMeC28	tr		tr		tr	tr	43	13,17,21-;11,17,25-triMeC37	tr		0,44	0,14	1,08	0,64
12	nC29							44	Xi-MeC38:1	tr		0,18	0,04	0,35	0,21
13	15-,13-,11-,7-MeC29	0,77	0,19	0,19	0,08	0,20	tr	45	15-,14-,13-,12-,11-,7-MeC38	tr		0,27	0,05	0,47	0,32
14	13,17-diMeC29	tr		tr		tr	tr	46	14,18-;13,17-diMeC38	1,29	0,38	1,06	0,15	1,40	1,09
15	13,17-; 11,19-diMeC29	tr		tr		tr	tr	47	12,16,20-triMeC38	tr		tr		0,18	tr
16	2-MeC29							48	13-MeC39:1	3,42	0,90	1,18	0,26	1,76	1,18
17	9,21-diMeC29	tr		tr		tr	tr	49	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	5,78	1,15	2,84	0,48	3,17	2,39
18	3-MeC29							50	13,19-diMeC39	12,45	1,96	8,21	0,73	7,53	8,46
19	nC30							51	13,17,21-triMeC39	tr		0,42	0,09	0,76	0,47
20	14-,13-,11-MeC30	tr		tr		tr	tr	52	20-,14-MeC40	tr		0,11	0,02	0,12	0,10
21	8-,9-MeC30	tr		tr		tr	tr	53	14,20-diMeC40	tr		0,22	0,03	0,21	0,25
22	2-MeC30							54	Xi-MeC41:1	tr		0,16	0,04	0,10	0,26
23	2,15-;2,13-;2,11-diMeC31	tr		tr		tr	tr	55	X'i-MeC41:1	tr		0,12	0,03	tr	tr
24	nC31							56	21-,19-,17-,15-,13-MeC41	0,62	0,18	0,61	0,10	0,38	0,45
25	15-,13-,11-MeC31	0,48	0,13	0,24	0,07	0,19	0,10	57	15,21-;13,21-;13,19-diMeC41	0,96	0,32	1,32	0,13	0,65	0,97
26	13,19-;11,19-diMeC31	tr		0,19	0,04	0,10	tr	58	13,17,21-triMeC41	tr		0,22	0,05	0,16	0,14
27	3-MeC31							59	14,22-diMeC42	tr		tr		tr	tr
28	Xi-MeC34:1	tr		tr		tr	tr	60	13-MeC43	tr		0,22	0,04	0,11	0,11
29	17-,15-,13-,11-MeC33	0,18	0,03	0,22	0,03	0,22	0,11	61	13,19-;13,21-diMeC43	0,46	0,21	1,11	0,21	0,45	0,41
30	13,17-diMeC33	0,23	0,03	0,41	0,10	0,45	0,27	62	13,17,21-triMeC43	tr		0,14	0,02	0,11	tr
31	17-,15-,14-,13-,12-MeC34	tr		tr		0,10	tr	63	13,21-diMeC45	tr		0,88	0,09	0,41	0,28
32	15,19-;13,17-diMeC34	tr		0,20	0,04	0,31	0,17								

Tableau 3b.3B: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la colonie **Pv6** de ***P. villosa*** classés par temps de rétention (moyenne ± e.s., n=5).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HCs de la PPG de Pv6 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Pv3" et "PPG Pv21".

HCS en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pv3	PPG Pv21	N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pv3	PPG Pv21
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.			Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.
1	nC26							33	Xi-MeC35:1	0,28	0,02	1,64	0,09	0,83	0,64
2	nC27							34	17-,15-,13-MeC35	1,02	0,06	2,88	0,11	2,05	1,58
3	13-,11-MeC27	tr		tr		tr	tr	35	Xi-diMeC35:1	tr		tr		tr	tr
4	9-MeC27	tr		tr		tr	tr	36	13,19-;13,17-diMeC35	9,16	0,99	17,74	0,72	15,90	13,62
5	7-MeC27	tr		tr		tr	tr	37	Xi-MeC36:1	tr		0,29	0,01	0,11	0,11
6	5-MeC27							38	14-MeC36	tr		0,57	0,02	0,33	0,35
7	nC28							39	14,18-;12,16-diMeC36	1,02	0,02	3,24	0,06	2,28	2,58
8	2-MeC28							40	Xi-MeC37:1	0,87	0,04	3,82	0,22	2,54	2,42
9	X-nC29:1	tr		tr		tr	tr	41	19-,17-,15-,13-MeC37	5,43	0,34	6,20	0,82	4,09	3,71
10	X'-nC29:1	tr		tr		tr	tr	42	15,19-;13,17-diMeC37	71,80	0,88	42,31	1,61	50,33	56,12
11	2,15-;2,13-diMeC28	tr		tr		tr	tr	43	13,17,21-;11,17,25-triMeC37	tr		1,08	0,11	0,44	0,64
12	nC29							44	Xi-MeC38:1	tr		0,35	0,04	0,18	0,21
13	15-,13-,11-,7-MeC29	0,63	0,09	0,20	0,02	0,19	tr	45	15-,14-,13-,12-,11-,7-MeC38	tr		0,47	0,05	0,27	0,32
14	13,17-diMeC29	tr		tr		tr	tr	46	14,18-;13,17-diMeC38	0,64	0,07	1,40	0,11	1,06	1,09
15	13,17-; 11,19-diMeC29	tr		tr		tr	tr	47	12,16,20-triMeC38	tr		0,18	0,02	tr	tr
16	2-MeC29							48	13-MeC39:1	0,77	0,15	1,76	0,16	1,18	1,18
17	9,21-diMeC29	tr		tr		tr	tr	49	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	2,31	0,47	3,17	0,16	2,84	2,39
18	3-MeC29							50	13,19-diMeC39	5,77	0,96	7,53	0,25	8,21	8,46
19	nC30							51	13,17,21-triMeC39	tr		0,76	0,06	0,42	0,47
20	14-,13-,11-MeC30	tr		tr		tr	tr	52	20-,14-MeC40	tr		0,12	0,01	0,11	0,10
21	8-,9-MeC30	tr		tr		tr	tr	53	14,20-diMeC40	tr		0,21	0,02	0,22	0,25
22	2-MeC30							54	Xi-MeC41:1	tr		0,10	0,01	0,16	0,26
23	2,15-;2,13-;2,11-diMeC31	tr		tr		tr	tr	55	X'i-MeC41:1	tr		tr		0,12	tr
24	nC31							56	21-,19-,17-,15-,13-MeC41	tr		0,38	0,04	0,61	0,45
25	15-,13-,11-MeC31	0,31	0,10	0,19	0,03	0,24	0,10	57	15,21-;13,21-;13,19-diMeC41	tr		0,65	0,07	1,32	0,97
26	13,19-;11,19-diMeC31	tr		0,10	0,01	0,19	tr	58	13,17,21-triMeC41	tr		0,16	0,02	0,22	0,14
27	3-MeC31							59	14,22-diMeC42	tr		tr		0,08	tr
28	Xi-MeC34:1	tr		tr		tr	tr	60	13-MeC43	tr		0,11	0,02	0,22	0,11
29	17-,15-,13-,11-MeC33	tr		0,22	0,02	0,22	0,11	61	13,19-;13,21-diMeC43	tr		0,45	0,08	1,11	0,41
30	13,17-diMeC33	tr		0,45	0,03	0,41	0,27	62	13,17,21-triMeC43	tr		0,11	0,02	0,14	tr
31	17-,15-,14-,13-,12-MeC34	tr		0,10	0,01	tr	tr	63	13,21-diMeC45	tr		0,41	0,07	0,88	0,28
32	15,19-;13,17-diMeC34	tr		0,31	0,02	0,20	0,17								

Tableau 3b.3C: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la colonie **Pv21** de *P. villosa* classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., $n=7$).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HCs de la PPG de Pv21 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Pv3" et "PPG Pv6".

HCs en gras : $>2\%$; trace (tr) : $<0,1\%$.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pv3	PPG Pv6	N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pv3	PPG Pv6
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.			Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.
1	nC26							33	Xi-MeC35:1	tr		0,64	0,08	0,83	1,64
2	nC27							34	17-,15-,13-MeC35	tr		1,58	0,16	2,05	2,88
3	13-,11-MeC27	tr		tr		tr	tr	35	Xi-diMeC35:1	tr		tr		tr	tr
4	9-MeC27	tr		tr		tr	tr	36	13,19-;13,17-diMeC35	6,43	1,45	13,62	0,79	15,90	17,74
5	7-MeC27	tr		tr		tr	tr	37	Xi-MeC36:1	tr		0,11	0,01	0,11	0,29
6	5-MeC27							38	14-MeC36	tr		0,35	0,02	0,33	0,57
7	nC28							39	14,18-;12,16-diMeC36	tr		2,58	0,10	2,28	3,24
8	2-MeC28							40	Xi-MeC37:1	tr		2,42	0,31	2,54	3,82
9	X-nC29:1	tr		tr		tr	tr	41	19-,17-,15-,13-MeC37	8,63	1,14	3,71	0,54	4,09	6,20
10	X'-nC29:1	tr		tr		tr	tr	42	15,19-;13,17-diMeC37	68,53	4,40	56,12	2,82	50,33	42,31
11	2,15-;2,13-diMeC28	tr		tr		tr	tr	43	13,17,21-;11,17,25-triMeC37	tr		0,64	0,13	0,44	1,08
12	nC29							44	Xi-MeC38:1	tr		0,21	0,05	0,18	0,35
13	15-,13-,11-,7-MeC29	tr		tr		0,19	0,20	45	15-,14-,13-,12-,11-,7-MeC38	tr		0,32	0,05	0,27	0,47
14	13,17-diMeC29	tr		tr		tr	tr	46	14,18-;13,17-diMeC38	tr		1,09	0,14	1,06	1,40
15	13,17-; 11,19-diMeC29	tr		tr		tr	tr	47	12,16,20-triMeC38	tr		0,09	0,02	tr	0,18
16	2-MeC29							48	13-MeC39:1	tr		1,18	0,17	1,18	1,76
17	9,21-diMeC29	tr		tr		tr	tr	49	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	4,38	1,09	2,39	0,28	2,84	3,17
18	3-MeC29							50	13,19-diMeC39	12,03	1,79	8,46	0,30	8,21	7,53
19	nC30							51	13,17,21-triMeC39	tr		0,47	0,07	0,42	0,76
20	14-,13-,11-MeC30	tr		tr		tr	tr	52	20-,14-MeC40	tr		0,10	0,02	0,11	0,12
21	8-,9-MeC30	tr		tr		tr	tr	53	14,20-diMeC40	tr		0,25	0,03	0,22	0,21
22	2-MeC30							54	Xi-MeC41:1	tr		0,26	0,05	0,16	0,10
23	2,15-;2,13-;2,11-diMeC31	tr		tr		tr	tr	55	X'i-MeC41:1	tr		tr		0,12	tr
24	nC31							56	21-,19-,17-,15-,13-MeC41	tr		0,45	0,07	0,61	0,38
25	15-,13-,11-MeC31	tr		0,10	0,01	0,24	0,19	57	15,21-;13,21-;13,19-diMeC41	tr		0,97	0,13	1,32	0,65
26	13,19-;11,19-diMeC31	tr		tr		0,19	0,10	58	13,17,21-triMeC41	tr		0,14	0,03	0,22	0,16
27	3-MeC31							59	14,22-diMeC42	tr		tr		tr	tr
28	Xi-MeC34:1	tr		tr		tr	tr	60	13-MeC43	tr		0,11	0,03	0,22	0,11
29	17-,15-,13-,11-MeC33	tr		0,11	0,01	0,22	0,22	61	13,19-;13,21-diMeC43	tr		0,41	0,09	1,11	0,45
30	13,17-diMeC33	tr		0,27	0,05	0,41	0,45	62	13,17,21-triMeC43	tr		tr		0,14	0,11
31	17-,15-,14-,13-,12-MeC34	tr		tr		tr	0,10	63	13,21-diMeC45	tr		0,28	0,05	0,88	0,41
32	15,19-;13,17-diMeC34	tr		0,17	0,02	0,20	0,31								

Tableau 3b.4A: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la colonie **Pi4** de ***P. inversa*** classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=4).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HCs de la PPG de Pi4 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Pi11" et "PPG Pi63".

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy. E.S.	PPG Moy. E.S.	PPG Pi11 Moy.	PPG Pi63 Moy.	N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy. E.S.	PPG Moy. E.S.	PPG Pi11 Moy.	PPG Pi63 Moy.
1	nC25					29	8,14-diMeC28	tr	0,44 0,20	tr	0,85
2	15-,13-,11-,9-MeC25	0,15 0,03	0,10 0,04	0,20	tr	30	3-MeC28				
3	7-MeC25	tr	tr	0,13	tr	31	6,14-diMeC28	tr	tr	tr	tr
4	3-MeC25					32	4,12-diMeC28	tr	tr	tr	tr
5	nC26					33	nC29:1	tr	tr	tr	tr
6	3,11-;3,9-diMeC25	tr	tr	0,18	tr	34	nC29				
7	13-,12-,10-,9-MeC26	0,19 0,07	0,13 0,03	0,14	tr	35	Xi-MeC29:1	3,68 2,12	tr	31,33	2,54
8	6-MeC26					36	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	49,49 5,42	52,83 7,73	35,26	24,33
9	4-,2-MeC26					37	5-MeC29				
10	3-MeC26					38	diMeC29:1	3,33 2,56	6,09 4,57	tr	5,30
11	nC27:1	tr	tr	tr	tr	39	11,15-;9,15-;9,13-diMeC29	4,92 2,57	6,74 2,76	3,35	6,36
12	nC27					40	3-MeC29				
13	3,11-;3,9-diMeC26	tr	tr	tr	tr	41	5,15-;5,11-diMeC29	tr	1,05 0,25	0,51	tr
14	Xi-MeC27:1	tr	tr	1,20	1,16	42	nC30				
15	13-,11-,9-,7-MeC27	28,01 9,53	18,12 8,91	4,72	38,68	43	3,11-diMeC29	tr	0,37 0,04	1,80	tr
16	5-MeC27					44	Xi-MeC30:1	tr	tr	0,56	tr
17	11,15-; 9,13-diMeC27	2,22 0,56	2,77 0,54	1,50	5,96	45	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	0,56 0,15	1,13 0,25	2,01	1,28
18	9-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	tr	tr	tr	tr	46	Xi-MeC31:1	tr	tr	3,26	tr
19	3-MeC27					47	15-,13-,11-MeC31	2,81 0,61	3,90 1,20	3,00	2,23
20	5,11-;5,9-diMeC27	tr	0,66 0,31	0,21	1,35	48	7-MeC31	tr	tr	tr	0,14
21	nC28:1	tr	tr	tr	tr	49	11,19-;11,15-diMeC31	0,21 0,09	1,02 0,45	tr	tr
22	nC28					50	13,17-diMeC31	tr	tr	0,19	tr
23	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27	0,67 0,39	0,92 0,39	4,92	tr	51	9,21-diMeC31	tr	tr	0,30	tr
24	Xi-MeC28:1	tr	tr	0,62	0,72	52	7,19-diMeC31	tr	tr	0,31	tr
25	14-,13-,12-,11-,10-MeC28	3,73 0,33	3,16 0,43	3,89	3,92	53	7,15-diMeC31	tr	tr	tr	1,06
26	6-MeC28					54	13-,11-MeC33	tr	tr	tr	0,89
27	4-,2-MeC28					55	11,21-diMeC33	tr	tr	tr	0,57
28	5,19-;5,14-diMeC28	tr	0,47 0,31	0,31	2,17	56	13,23-diMeC35	tr	tr	tr	0,49

Tableau 3b.4B: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la colonie **Pi11** de ***P. inversa*** classés par temps de rétention (moyenne ± e.s., n=10).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HCs de la PPG de PI11 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Pi4" et "PPG Pi63".

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pi4	PPG Pi63	N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pi4	PPG Pi63
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.			Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.
1	nC25							29	8,14-diMeC28	tr		tr		0,44	0,85
2	15-,13-,11-,9-MeC25	0,13	0,01	0,20	0,02	0,10	tr	30	3-MeC28						
3	7-MeC25	0,12	0,01	0,13	0,01	tr	tr	31	6,14-diMeC28	tr		tr		tr	tr
4	3-MeC25							32	4,12-diMeC28	tr		tr		tr	tr
5	nC26							33	nC29:1	5,18	0,39	tr		tr	tr
6	3,11-;3,9-diMeC25	tr		0,18	0,01	tr	tr	34	nC29						
7	13-,12-,10-,9-MeC26	tr		0,14	0,01	0,13	tr	35	Xi-MeC29:1	32,96	0,58	31,33	0,96	tr	2,54
8	6-MeC26							36	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	30,38	0,72	35,26	0,72	52,83	24,33
9	4-,2-MeC26							37	5-MeC29						
10	3-MeC26							38	diMeC29:1	tr		tr		6,09	5,30
11	nC27:1	4,97	0,54	tr		tr	tr	39	11,15-;9,15-;9,13-diMeC29	1,70	0,23	3,35	0,34	6,74	6,36
12	nC27							40	3-MeC29						
13	3,11-;3,9-diMeC26	tr		tr		tr	tr	41	5,15-;5,11-diMeC29	tr		0,51	0,03	1,05	tr
14	Xi-MeC27:1	1,74	0,18	1,20	0,13	tr	1,16	42	nC30						
15	13-,11-,9-,7-MeC27	5,57	0,43	4,72	0,34	18,12	38,68	43	3,11-diMeC29	1,17	0,11	1,80	0,28	0,37	tr
16	5-MeC27							44	Xi-MeC30:1	0,51	0,06	0,56	0,07	tr	tr
17	11,15-; 9,13-diMeC27	0,66	0,05	1,50	0,09	2,77	5,96	45	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	1,38	0,13	2,01	0,14	1,13	1,28
18	9-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	tr		tr		tr	tr	46	Xi-MeC31:1	2,44	0,36	3,26	0,44	tr	tr
19	3-MeC27							47	15-,13-,11-MeC31	2,36	0,20	3,00	0,22	3,90	2,23
20	5,11-;5,9-diMeC27	tr		0,21	0,01	0,66	1,35	48	7-MeC31	tr		tr		tr	0,14
21	nC28:1	0,65	0,06	tr		tr	tr	49	11,19-;11,15-diMeC31	tr		tr		1,02	tr
22	nC28							50	13,17-diMeC31	tr		0,19	0,04	tr	tr
23	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27	3,69	0,31	4,92	0,39	0,92	tr	51	9,21-diMeC31	tr		0,30	0,04	tr	tr
24	Xi-MeC28:1	0,81	0,05	0,62	0,06	tr	0,72	52	7,19-diMeC31	tr		0,31	0,05	tr	tr
25	14-,13-,12-,11-,10-MeC28	3,57	0,13	3,89	0,12	3,16	3,92	53	7,15-diMeC31	tr		tr		tr	1,06
26	6-MeC28							54	13-,11-MeC33	tr		tr		tr	0,89
27	4-,2-MeC28							55	11,21-diMeC33	tr		tr		tr	0,57
28	5,19-;5,14-diMeC28	tr		0,31	0,03	0,47	2,17	56	13,23-diMeC35	tr		tr		tr	0,49

Tableau 3b.4C: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la colonie **Pi63** de *P. inversa* classés par temps de rétention (moyenne ± e.s., n=8).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HCs de la PPG de Pi63 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Pi4" et "PPG Pi11".

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pi4	PPG Pi11	N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Pi4	PPG Pi11
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.					Moy.	E.S.	Moy.	E.S.		
1	nC25							29	8,14-diMeC28	tr		0,85	0,32	0,44	tr
2	15-,13-,11-,9-MeC25	tr		tr		0,10	0,20	30	3-MeC28						
3	7-MeC25	tr		tr		tr	0,13	31	6,14-diMeC28	tr	tr		tr	tr	
4	3-MeC25							32	4,12-diMeC28	tr	tr		tr	tr	
5	nC26							33	nC29:1	tr	tr		tr	tr	
6	3,11-;3,9-diMeC25	tr		tr		tr	0,18	34	nC29						
7	13-,12-,10-,9-MeC26	1,01	0,20	tr		0,13	0,14	35	Xi-MeC29:1	2,45	0,58	2,54	0,37	tr	31,33
8	6-MeC26							36	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	22,40	1,91	24,33	1,42	52,83	35,26
9	4-,2-MeC26							37	5-MeC29						
10	3-MeC26							38	diMeC29:1	2,08	0,58	5,30	1,62	6,09	tr
11	nC27:1	1,16	0,42	tr		tr	tr	39	11,15-;9,15-;9,13-diMeC29	2,57	0,78	6,36	1,11	6,74	3,35
12	nC27							40	3-MeC29						
13	3,11-;3,9-diMeC26	tr		tr		tr	tr	41	5,15-;5,11-diMeC29	tr	tr			1,05	0,51
14	Xi-MeC27:1	0,88	0,57	1,16	0,18	tr	1,20	42	nC30						
15	13-,11-,9-,7-MeC27	62,35	3,57	38,68	2,38	18,12	4,72	43	3,11-diMeC29	tr	tr			0,37	1,80
16	5-MeC27							44	Xi-MeC30:1	tr	tr			tr	0,56
17	11,15-; 9,13-diMeC27	tr		5,96	0,51	2,77	1,50	45	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	tr		1,28	0,10	1,13	2,01
18	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	0,98	0,25	tr		tr	tr	46	Xi-MeC31:1	tr	tr			tr	3,26
19	3-MeC27							47	15-,13-,11-MeC31	1,00	0,17	2,23	0,20	3,90	3,00
20	5,11-;5,9-diMeC27	tr		1,35	0,10	0,66	0,21	48	7-MeC31	tr		0,14	0,03	tr	tr
21	nC28:1	tr		tr		tr	tr	49	11,19-;11,15-diMeC31	tr	tr			1,02	tr
22	nC28							50	13,17-diMeC31	tr	tr			tr	0,19
23	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27	tr		tr		0,92	4,92	51	9,21-diMeC31	tr	tr			tr	0,30
24	Xi-MeC28:1	tr		0,72	0,06	tr	0,62	52	7,19-diMeC31	tr	tr			tr	0,31
25	14-,13-,12-,11-,10-MeC28	3,13	0,55	3,92	0,13	3,16	3,89	53	7,15-diMeC31	tr		1,06	0,16	tr	tr
26	6-MeC28							54	13-,11-MeC33	tr		0,89	0,11	tr	tr
27	4-,2-MeC28							55	11,21-diMeC33	tr		0,57	0,06	tr	tr
28	5,19-;5,14-diMeC28	tr		2,17	0,12	0,47	0,31	56	13,23-diMeC35	tr		0,49	0,07	tr	tr

Tableau 3b.5A: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs de la colonie **Ps24** de ***P. subversa*** classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=5).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HCs de la PPG de Ps24 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Ps20" et "PPG Ps32".

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Ps20	PPG Ps32	N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Ps20	PPG Ps32
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.			Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.
1	nC23							30	4,18-;4,16-;4,14-diMeC26	0,12	0,02	0,51	0,03	0,59	0,57
2	11-,9-,7-MeC23	tr		0,26	0,05	0,13	tr	31	nC27						
3	5-MeC23							32	3,15-;3,13-diMeC26	tr		0,10	0,01	tr	tr
4	3-MeC23							33	13-,11-,9-,7-MeC27	1,99	0,36	2,30	0,20	2,33	2,02
5	7,15-;5,17-;5,15-;5,11-diMeC23	tr		0,99	0,12	0,91	0,64	34	5-MeC27						
6	nC24							35	3-MeC27						
7	3,7-diMeC23	tr		tr		tr	tr	36	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	1,36	0,22	3,20	0,19	3,56	4,00
8	5,11,15-triMeC23	tr		tr		tr	tr	37	nC28						
9	5,9,17-triMeC23	tr		0,10	0,04	0,12	tr	38	3,19-;3,17-;3,15-diMeC27	tr		0,29	0,06	0,27	0,27
10	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24	tr		0,63	0,06	1,31	0,35	39	5,15,17-triMeC27	tr		tr		tr	tr
11	6-,5-MeC24							40	5,9,17-triMeC27	tr		tr		tr	tr
12	4-,2-MeC24							41	nC29						
13	3-MeC24							42	15-,13-,11-,7-MeC29	tr		0,13	0,03	0,49	0,15
14	6,12-diMeC24	tr		tr		0,14	tr	43	5-MeC29						
15	5,15-diMeC24	tr		0,46	0,05	0,51	0,35	44	3-MeC29						
16	nC25							45	5,17-diMeC29	tr		tr		tr	0,15
17	13-,11-,9-MeC25	18,74	1,60	17,44	1,39	16,86	14,25	46	15-,13-,11-,9-MeC31	tr		tr		tr	tr
18	7-MeC25	10,18	0,71	7,04	0,40	6,66	4,46	47	11,19-diMeC31	tr		tr		tr	tr
19	5-MeC25							48	7,19-diMeC31	tr		tr		tr	tr
20	3-MeC25							49	11,21-diMeC33	tr		tr		tr	tr
21	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25	62,34	3,04	54,55	1,31	56,97	58,70	50	12,22-diMeC34	tr		tr		tr	tr
22	nC26							51	15-,13-MeC35	tr		0,19	0,03	tr	tr
23	3,17-;3,15-;3,13-diMeC25	2,65	0,66	3,41	0,07	3,52	3,51	52	13,23-diMeC35	0,21	0,04	3,14	0,17	1,00	3,16
24	5,13,17-triMeC25	0,56	0,10	1,26	0,07	1,73	1,74	53	13,23-diMeC36	tr		tr		tr	0,22
25	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	0,92	0,16	1,09	0,11	0,87	0,86	54	13-MeC37	tr		tr		tr	0,19
26	6-,5-MeC26							55	13,25-;15,23-diMeC37	0,23	0,03	1,66	0,15	0,62	2,38
27	4-,2-MeC26							56	13,25-;15,25-diMeC38	tr		tr		tr	tr
28	3-MeC26							57	13,25-;13,23-diMeC39	tr		tr		tr	0,30
29	6,18-;6,14-;5,17-diMeC26	0,39	0,05	1,10	0,07	1,12	1,02								

Tableau 3b.5B: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HCs

de la colonie **Ps20** de *P. subversa* classés par temps de rétention (moyenne ± e.s., n=6).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HCs de la PPG de Ps20 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Ps24" et "PPG Ps32".

HCS en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Ps24	PPG Ps32	N°	Hydrocarbures	Cuticule		PPG		PPG Ps24	PPG Ps32
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.			Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	Moy.
1	nC23							30	4,18-;4,16-;4,14-diMeC26	0,18	0,05	0,59	0,05	0,51	0,57
2	11-,9-,7-MeC23	tr		0,13	0,03	0,26	tr	31	nC27						
3	5-MeC23							32	3,15-;3,13-diMeC26	tr		tr		0,10	tr
4	3-MeC23							33	13-,11-,9-,7-MeC27	1,86	0,42	2,33	0,36	2,30	2,02
5	7,15-;5,17-;5,15-;5,11-diMeC23	tr		0,91	0,17	0,99	0,64	34	5-MeC27						
6	nC24							35	3-MeC27						
7	3,7-diMeC23	tr		tr		tr	tr	36	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	1,64	0,41	3,56	0,32	3,20	4,00
8	5,11,15-triMeC23	tr		tr		tr	tr	37	nC28						
9	5,9,17-triMeC23	tr		0,12	0,04	0,10	tr	38	3,19-;3,17-;3,15-diMeC27	tr		0,27	0,03	0,29	0,27
10	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24	tr		1,31	0,65	0,63	0,35	39	5,15,17-triMeC27	tr		tr		tr	tr
11	6-,5-MeC24							40	5,9,17-triMeC27	tr		tr		tr	tr
12	4-,2-MeC24							41	nC29						
13	3-MeC24							42	15-,13-,11-,7-MeC29	0,18	0,10	0,49	0,26	0,13	0,15
14	6,12-diMeC24	tr		0,14	0,01	tr	tr	43	5-MeC29						
15	5,15-diMeC24	tr		0,51	0,02	0,46	0,35	44	3-MeC29						
16	nC25							45	5,17-diMeC29	tr		tr		tr	0,15
17	13-,11-,9-MeC25	10,18	1,67	16,86	1,14	17,44	14,25	46	15-,13-,11-,9-MeC31	tr		tr		tr	tr
18	7-MeC25	6,57	1,00	6,66	0,42	7,04	4,46	47	11,19-diMeC31	tr		tr		tr	tr
19	5-MeC25							48	7,19-diMeC31	tr		tr		tr	tr
20	3-MeC25							49	11,21-diMeC33	tr		tr		tr	tr
21	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25	74,73	3,65	56,97	1,36	54,55	58,70	50	12,22-diMeC34	tr		tr		tr	tr
22	nC26							51	15-,13-MeC35	tr		tr		0,19	tr
23	3,17-;3,15-;3,13-diMeC25	2,40	0,39	3,52	0,35	3,41	3,51	52	13,23-diMeC35	tr		1,00	0,59	3,14	3,16
24	5,13,17-triMeC25	0,78	0,21	1,73	0,15	1,26	1,74	53	13,23-diMeC36	tr		tr		tr	0,22
25	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	0,66	0,17	0,87	0,09	1,09	0,86	54	13-MeC37	tr		tr		tr	0,19
26	6-,5-MeC26							55	13,25-;15,23-diMeC37	tr		0,62	0,43	1,66	2,38
27	4-,2-MeC26							56	13,25-;15,25-diMeC38	tr		tr		tr	tr
28	3-MeC26							57	13,25-;13,23-diMeC39	tr		tr		tr	0,30
29	6,18-;6,14-;5,17-diMeC26	0,43	0,08	1,12	0,07	1,10	1,02								

Tableau 3b.5C: Comparaison, entre la cuticule et la PPG, des **pourcentages recalculés** (sans les *n*-alcanes et les MeA-Ext) des HC de la colonie **Ps32** de ***P. subversa*** classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=5).

Les valeurs **significativement différentes** entre les pourcentages recalculés des HC de la PPG de Ps32 et ceux des 2 autres colonies sont représentées dans les colonnes "PPG Ps24" et "PPG Ps20".

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

En jaune: pourcentage statistiquement non différent entre la cuticule et la PPG.

N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy. E.S.	PPG Moy. E.S.	PPG Ps24 Moy.	PPG Ps20 Moy.	N°	Hydrocarbures	Cuticule Moy. E.S.	PPG Moy. E.S.	PPG Ps24 Moy.	PPG Ps20 Moy.
1	nC23					30	4,18-;4,16-;4,14-diMeC26	0,25 0,07	0,57 0,07	0,51	0,59
2	11-,9-,7-MeC23	0,16 0,05	tr	0,26	0,13	31	nC27				
3	5-MeC23					32	3,15-;3,13-diMeC26	tr	tr	0,10	tr
4	3-MeC23					33	13-,11-,9-,7-MeC27	3,38 0,35	2,02 0,30	2,30	2,33
5	7,15-;5,17-;5,15-;5,11-diMeC23	0,45 0,14	0,64 0,03	0,99	0,91	34	5-MeC27				
6	nC24					35	3-MeC27				
7	3,7-diMeC23	tr	tr	tr	tr	36	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	2,79 0,44	4,00 0,74	3,20	3,56
8	5,11,15-triMeC23	tr	tr			37	nC28				
9	5,9,17-triMeC23	tr	tr	0,10	0,12	38	3,19-;3,17-;3,15-diMeC27	0,29 0,08	0,27 0,04	0,29	0,27
10	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24	0,38 0,07	0,35 0,02	0,63	1,31	39	5,15,17-triMeC27	tr	tr	tr	tr
11	6-,5-MeC24					40	5,9,17-triMeC27	tr	tr	tr	tr
12	4-,2-MeC24					41	nC29				
13	3-MeC24					42	15-,13-,11-,7-MeC29	2,05 1,00	0,15 0,04	0,13	0,49
14	6,12-diMeC24	tr	tr	tr	0,14	43	5-MeC29				
15	5,15-diMeC24	tr	0,35 0,02	0,46	0,51	44	3-MeC29				
16	nC25					45	5,17-diMeC29	0,12 0,05	0,15 0,06	tr	tr
17	13-,11-,9-MeC25	15,51 2,12	14,25 1,00	17,44	16,86	46	15-,13-,11-,9-MeC31	tr	tr	tr	tr
18	7-MeC25	9,00 0,34	4,46 0,45	7,04	6,66	47	11,19-diMeC31	tr	tr	tr	tr
19	5-MeC25					48	7,19-diMeC31	tr	tr	tr	tr
20	3-MeC25					49	11,21-diMeC33	tr	tr	tr	tr
21	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25	57,16 2,21	58,70 1,84	54,55	56,97	50	12,22-diMeC34	tr	tr	tr	tr
22	nC26					51	15-,13-MeC35	tr	tr	0,19	tr
23	3,17-;3,15-;3,13-diMeC25	3,66 0,62	3,51 0,25	3,41	3,52	52	13,23-diMeC35	0,57 0,28	3,16 0,56	3,14	1,00
24	5,13,17-triMeC25	1,48 0,55	1,74 0,13	1,26	1,73	53	13,23-diMeC36	tr	0,22 0,05	tr	tr
25	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	1,46 0,15	0,86 0,09	1,09	0,87	54	13-MeC37	tr	0,19 0,04	tr	tr
26	6-,5-MeC26					55	13,25-;15,23-diMeC37	0,63 0,22	2,38 0,53	1,66	0,62
27	4-,2-MeC26					56	13,25-;15,25-diMeC38	tr	tr	tr	tr
28	3-MeC26					57	13,25-;13,23-diMeC39	tr	0,30 0,08	tr	tr
29	6,18-;6,14-;5,17-diMeC26	0,57 0,09	1,02 0,09	1,10	1,12						

Tableau 3b.6A: Pourcentages des HCs de la **cuticule des 3 colonies de *P. villosa*** classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=6, 7 et 9 respectivement).
HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

N°	Hydrocarbures	Pv3		Pv6		Pv21		<i>P. villosa</i>	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC28	0,13	0,05	tr		tr		tr	
2	2-MeC28	3,36	0,87	1,60	0,32	1,97	0,50	2,23	0,35
3	nC29	1,46	0,37	0,72	0,17	2,50	0,61	1,65	0,31
4	15-,13-,11-MeC29	0,60	0,14	0,40	0,09	tr		0,29	0,07
5	2-MeC29	tr		tr		tr		tr	
6	3-MeC29	7,94	1,63	5,07	0,76	9,66	1,17	7,73	0,79
7	nC30	0,41	0,10	0,42	0,14	1,20	0,18	0,74	0,12
8	2-MeC30	4,75	1,14	3,45	1,02	3,90	0,52	3,99	0,48
9	nC31	0,36	0,09	tr		0,57	0,14	0,36	0,07
10	15-,13-,11-MeC31	0,38	0,10	0,20	0,06	tr		0,17	0,05
11	3-MeC31	1,40	0,36	0,73	0,10	1,91	0,31	1,40	0,19
12	13-,11-MeC33	0,14	0,02	tr		tr		tr	
13	13,17-diMeC33	0,18	0,02	tr		tr		tr	
14	Xi-MeC35:1	0,40	0,11	0,21	0,03	tr		0,17	0,05
15	17-,15-,13-MeC35	1,04	0,14	0,76	0,10	tr		0,52	0,11
16	diMeC35:1	0,12	0,03	tr		tr		tr	
17	13,19-;13,17-diMeC35	8,18	1,40	7,81	0,58	4,15	0,71	6,42	0,64
18	14,18-;12,16-diMeC36	1,25	0,13	0,78	0,06	tr		0,59	0,12
19	Xi-MeC37:1	3,55	0,28	0,66	0,08	tr		1,18	0,33
20	19-,17-,15-,13-MeC37	5,95	0,42	4,32	0,34	5,92	0,51	5,42	0,30
21	15,19-;13,17-diMeC37	38,81	4,80	65,42	3,10	56,94	4,98	54,69	3,37
22	14,18-;13,17-diMeC38	1,04	0,31	0,49	0,06	tr		0,44	0,12
23	Xi-MeC39:1	2,69	0,69	0,52	0,13	tr		0,90	0,30
24	19-,17-,15-,14-,13-MeC39	4,51	0,82	1,75	0,33	3,03	0,65	3,03	0,42
25	13,19-diMeC39	9,79	1,36	4,47	0,71	8,26	1,11	7,47	0,76
26	21-,19-,15-,13-MeC41	0,48	0,13	tr		tr		0,13	0,06
27	15,21-;13,19-diMeC41	0,74	0,24	tr		tr		0,20	0,09
28	13-,19-diMeC43	0,36	0,16	tr		tr		tr	

Tableau 3b.6B: Pourcentages des HCs de la **cuticule des 3 colonies de *P. inversa***

classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=6, 10 et 8 respectivement).

HCS en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

N°	Hydrocarbures	Pi4		Pi11		Pi63		<i>P. inversa</i>	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC25	0,43	0,17	0,23	0,02	0,36	0,10	0,32	0,05
2	13-,11-,9-MeC25	0,15	0,06	tr		tr		tr	
3	7-MeC25	tr		tr		tr		tr	
4	3-MeC25	0,15	0,09	tr		tr		tr	
5	nC26	0,54	0,12	0,46	0,09	0,65	0,09	0,54	0,09
6	12-,11-,10-MeC26	0,22	0,12	tr		0,39	0,07	0,18	0,05
7	6-MeC26	tr		tr		tr		tr	
9	4-,2-MeC26	0,14	0,04	tr		0,82	0,15	0,35	0,09
10	3-MeC26	0,10	0,03	tr		0,29	0,13	0,15	0,05
11	nC27:1	tr		1,98	0,15	0,45	0,16	0,97	0,20
12	nC27	16,87	1,94	19,36	1,43	28,75	2,87	21,87	1,56
13	Xi-MeC27:1	tr		0,72	0,09	0,40	0,29	0,44	0,12
14	13-,11-,9-,7-MeC27	18,62	3,93	2,32	0,23	24,49	1,91	13,78	2,35
15	5-MeC27	tr		tr		tr		tr	
16	9,13-;11,15-diMeC27	0,89	0,26	0,27	0,02	tr		0,33	0,09
17	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	tr		tr		0,39	0,11	0,13	0,05
18	3-MeC27	14,60	2,59	8,03	1,03	19,75	1,78	13,58	1,41
19	nC28:1	tr		0,26	0,01	tr		0,11	0,03
20	nC28	2,51	0,37	4,59	0,21	1,73	0,19	3,12	0,30
21	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27	0,86	0,46	1,53	0,15	tr		0,85	0,18
22	Xi-MeC28:1	tr		0,34	0,03	tr		0,14	0,04
23	14-,13-,12-,11-,10-MeC28	2,18	0,21	1,50	0,12	1,24	0,22	1,58	0,12
24	6-MeC28	0,11	0,04	0,21	0,02	tr		0,12	0,02
26	4-,2-MeC28	0,72	0,21	0,95	0,08	2,03	0,29	1,25	0,16
27	3-MeC28	0,44	0,07	0,36	0,03	0,46	0,10	0,41	0,04
28	nC29:1	tr		2,09	0,08	tr		0,87	0,22
29	nC29	4,11	1,03	15,58	1,58	3,26	0,20	8,61	1,41
30	Xi-MeC29:1	1,39	0,89	13,83	1,00	1,00	0,27	6,44	1,38
31	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	24,80	2,87	12,74	0,95	8,82	0,91	14,45	1,53
32	5-MeC29	tr		tr		tr		tr	
33	diMeC29:1	1,33	1,10	tr		0,83	0,24	0,61	0,29
34	9,13-;11,15-diMeC29	1,95	1,17	0,71	0,11	1,06	0,34	1,14	0,31
36	3-MeC29	5,32	0,82	8,31	1,00	3,02	0,40	5,80	0,67
37	nC30	tr		0,19	0,03	tr		tr	
38	3,X-diMeC29	tr		0,48	0,04	tr		0,20	0,05
39	Xi-MeC30:1	tr		0,22	0,03	tr		tr	
40	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	0,26	0,07	0,59	0,08	tr		0,31	0,06
41	Xi-MeC31:1	tr		1,04	0,19	tr		0,43	0,13
42	15-,13-,11-MeC31	1,26	0,27	1,00	0,12	0,38	0,07	0,86	0,11
43	11,15-diMeC31	tr		tr		tr		tr	

Tableau 3b.6C: Pourcentages des HCs de la **cuticule des 3 colonies de *P. subversa***

classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=5, 8 et 6 respectivement).

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

N°	Hydrocarbures	Ps24		Ps20		Ps32		<i>P. subversa</i>	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC23	tr		tr		0,14	0,06	tr	
2	11-,9-,7-MeC23	tr		tr		tr		tr	
3	5-MeC23	tr		tr		0,10	0,02	tr	
4	3-MeC23	tr		tr		tr		tr	
6	5,15-;5,17-;7,15-diMeC23	tr		tr		0,21	0,06	tr	
7	nC24	tr		tr		0,38	0,08	0,17	0,04
8	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24	tr		tr		0,17	0,03	tr	
9	6-,5-MeC24	tr		tr		0,20	0,03	tr	
10	4-,2-MeC24	tr		tr		0,13	0,01	tr	
12	3-MeC24	tr		tr		0,39	0,17	0,13	0,07
13	nC25	27,43	1,55	10,75	2,24	15,00	2,02	16,48	1,97
14	13-,11-,9-MeC25	7,59	0,68	3,87	0,70	7,15	1,02	5,88	0,60
15	7-MeC25	4,14	0,37	2,46	0,35	4,30	0,35	3,48	0,29
16	5-MeC25	10,95	0,41	11,96	0,97	9,92	1,07	11,05	0,56
17	3-MeC25	18,80	1,43	26,48	1,86	17,07	1,43	21,49	1,38
18	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25	25,26	1,54	34,99	2,82	32,52	3,47	31,65	1,84
19	nC26 (sans SI: nC26)	0,92	0,00	0,75	0,48	1,63	0,34	0,92	0,34
20	3,17-;3,15-;3,13-diMeC25	1,05	0,25	0,94	0,14	1,88	0,31	1,27	0,16
21	5,13,17-triMeC25	0,23	0,04	0,32	0,07	0,67	0,21	0,41	0,08
22	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	0,37	0,06	0,28	0,06	0,65	0,12	0,42	0,06
23	6-,5-MeC26	0,18	0,04	0,17	0,03	0,33	0,07	0,22	0,03
25	4-,2-MeC26	tr		tr		tr		tr	
26	3-MeC26	tr		tr		tr		tr	
27	6,18-;6,14-;5,17-diMeC26	0,16	0,02	0,19	0,03	0,26	0,06	0,21	0,02
30	4,18-;4,16-;4,14-diMeC26	tr		tr		0,12	0,03	tr	
31	nC27	1,15	0,24	1,57	0,67	1,10	0,12	1,31	0,29
32	3,13-;3,15-diMeC26	tr		tr		tr		tr	
33	13-,11-,9-,7-MeC27	0,80	0,13	1,13	0,24	1,62	0,23	1,20	0,14
34	5-MeC27	0,15	0,04	0,65	0,44	0,29	0,05	0,40	0,18
35	3-MeC27	0,32	0,08	1,13	0,50	1,48	0,47	1,03	0,27
36	5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	0,54	0,08	1,32	0,52	1,37	0,22	1,13	0,24
37	nC28	tr		tr		tr		tr	
38	3,19-;3,17-;3,15-diMeC27	tr		tr		0,13	0,03	tr	
39	nC29	tr		0,11	0,04	0,12	0,01	0,10	0,02
40	15-,13-,11-,7-MeC29	tr		0,33	0,17	0,89	0,46	0,42	0,17
42	5-MeC29	tr		tr		tr		tr	
43	3-MeC29	tr		tr		tr		tr	
44	5,17-diMeC29	tr		0,36	0,33	tr		0,17	0,14
45	13,23-diMeC35	tr		tr		0,31	0,11	0,13	0,05
46	13,25-;15,23-diMeC37	tr		tr		0,29	0,09	0,12	0,04

Tableau 3b.7A: Pourcentages des HC's de la **PPG des 3 colonies de *P. villosa***

classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=6, 7 et 9 respectivement).

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

N°	Hydrocarbures	Pv3		Pv6		Pv21		<i>P. villosa</i>	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC26	tr		tr		tr		tr	
2	nC27	tr		tr		tr		tr	
3	13-,11-,9-,7-MeC27	tr		tr		tr		tr	
4	5-MeC27	tr		tr		tr		tr	
5	nC28	tr		tr		tr		tr	
6	2-MeC28	tr		tr		tr		tr	
7	X-C29:1	tr		tr		tr		tr	
8	X'-C29:1	tr		tr		tr		tr	
9	2,13-;2,15-diMeC28	tr		tr		tr		tr	
10	nC29	tr		tr		tr		tr	
11	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	0,19	0,08	0,21	0,02	tr		0,14	0,03
12	13,17-;11,19-diMeC29	tr		tr		tr		tr	
13	9,21-diMeC29	tr		tr		tr		tr	
14	3-MeC29	0,16	0,05	0,17	0,02	0,13	0,01	0,15	0,02
15	nC30	tr		tr		tr		tr	
16	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	tr		tr		tr		tr	
17	8-,9-MeC30	tr		tr		tr		tr	
18	2-MeC30	0,14	0,03	0,17	0,03	0,16	0,02	0,16	0,02
19	2,15-;2,13-;2,11-diMeC31	tr		tr		tr		tr	
20	15-,13-,11-,9-MeC31	0,24	0,07	0,20	0,02	0,11	0,01	0,17	0,02
21	13,19-;11,19-;11,15-diMeC31	0,19	0,04	0,11	0,01	0,10	0,02	0,13	0,01
22	3-MeC31	tr		tr		tr		tr	
23	Xi-MeC34:1	tr		tr		tr		tr	
24	17-,15-,13-,11-MeC33	0,22	0,03	0,24	0,02	0,11	0,01	0,18	0,02
25	13,17-diMeC33	0,41	0,10	0,50	0,04	0,29	0,04	0,39	0,04
26	17-,15-,14-,13-,12-MeC34	tr		0,11	0,01	tr		tr	
27	13,17-;15,19-diMeC34	0,20	0,04	0,34	0,02	0,18	0,02	0,23	0,02
28	Xi-MeC35:1	0,83	0,20	1,55	0,09	0,66	0,07	0,99	0,11
29	17-,15-,13-MeC35	2,04	0,18	2,94	0,16	1,58	0,12	2,14	0,15
30	13,17-diMeC35	15,82	2,47	19,09	1,06	13,51	0,61	15,91	0,91
31	Xi-MeC36:1	0,11	0,02	0,26	0,02	0,12	0,01	0,16	0,02
32	14-MeC36	0,32	0,02	0,54	0,02	0,37	0,02	0,41	0,02
33	14,18-;12,16-diMeC36	2,27	0,12	3,31	0,07	2,62	0,09	2,74	0,10
34	Xi-MeC37:1	2,53	0,45	3,50	0,31	2,60	0,26	2,86	0,20
35	19-,17-,15-,13-MeC37	4,07	0,61	5,56	0,73	4,55	0,71	4,74	0,41
36	13,17-diMeC37	50,09	3,01	42,20	1,44	53,49	2,65	48,97	1,73
37	13,17,21-;11,17,25-triMeC37	0,44	0,14	1,06	0,12	0,75	0,13	0,77	0,09
38	Xi-MeC38:1	0,18	0,04	0,30	0,04	0,25	0,05	0,25	0,03
39	15-,14-,13-,12-,11-,7-MeC38	0,27	0,05	0,43	0,04	0,36	0,05	0,36	0,03
40	14,18-diMeC38	1,05	0,15	1,35	0,09	1,19	0,12	1,20	0,07
41	12,16,20-triMeC38	tr		0,17	0,02	0,10	0,01	0,11	0,01
42	13-MeC39:1	1,17	0,26	1,57	0,18	1,31	0,16	1,36	0,11
43	19-,17-,15-,13-MeC39	2,82	0,48	2,90	0,20	2,55	0,24	2,73	0,17
44	13,19-diMeC39	8,17	0,72	7,26	0,22	8,65	0,28	8,08	0,26
45	13,17,21-triMeC39	0,41	0,09	0,71	0,07	0,54	0,08	0,56	0,05
46	20-,14-MeC40	0,11	0,02	0,11	0,01	0,11	0,01	0,11	0,01
47	14,20-diMeC40	0,22	0,03	0,20	0,02	0,27	0,03	0,23	0,02
48	Xi-MeC41:1	0,16	0,04	tr		0,29	0,04	0,19	0,03
49	X'i-MeC41:1	0,12	0,03	tr		tr		tr	
50	19-,17-,15-,13-MeC41	0,60	0,09	0,36	0,04	0,49	0,06	0,48	0,04
51	13,21-diMeC41	1,31	0,12	0,66	0,08	1,02	0,11	0,99	0,08
52	13,17,21-triMeC41	0,22	0,05	0,18	0,03	0,15	0,02	0,18	0,02
53	14,22-diMeC42	0,08	0,01	tr		tr		tr	
54	13-MeC43	0,22	0,04	0,11	0,02	0,12	0,02	0,14	0,02
55	13,21-;13,19-diMeC43	1,10	0,21	0,44	0,07	0,44	0,07	0,62	0,09
56	13,17,21-triMeC43	0,14	0,02	0,11	0,02	tr		tr	
57	13,21-diMeC45	0,88	0,09	0,44	0,07	0,30	0,04	0,50	0,06

Tableau 3b.7B: Pourcentages des HCs de la PPG des 3 colonies de *P. inversa*

classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=6, 9 et 8 respectivement).

HCS en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

N°	Hydrocarbures	Pi4		Pi11		Pi63		<i>P. inversa</i>	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC25	tr		0,10	0,02	tr		tr	
2	15-,13-,11-,9-MeC25	0,27	0,12	0,17	0,01	tr		0,14	0,04
3	7-MeC25	0,16	0,08	0,11	0,01	tr		tr	
4	3-MeC25	0,26	0,14	tr		tr		0,10	0,04
5	nC26	tr		0,14	0,03	tr		tr	
6	3,11-;3,9-diMeC25	tr		0,15	0,01	tr		tr	
7	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	0,30	0,13	0,12	0,01	tr		0,12	0,04
8	6-,5-MeC26	tr		tr		tr		tr	
9	4-,2-MeC26	0,16	0,08	tr		tr		tr	
10	3-MeC26	0,16	0,07	tr		tr		tr	
11	nC27	0,72	0,19	1,18	0,23	1,56	0,13	1,19	0,13
12	3,11-;3,9-diMeC26	tr		tr		tr		tr	
13	Xi-MeC27:1	tr		1,02	0,12	0,95	0,17	0,73	0,12
14	13-,11-,9-,7-MeC27	19,60	5,39	4,01	0,29	30,40	1,24	17,26	2,80
15	5-MeC27	tr		0,14	0,01	tr		tr	
16	9,13-;11,15-diMeC27	2,50	0,36	1,27	0,08	4,72	0,44	2,79	0,36
17	3-MeC27	9,21	2,01	2,50	0,30	11,35	1,54	7,33	1,11
18	5,11-;5,9-diMeC27	0,72	0,20	0,18	0,01	1,06	0,06	0,62	0,10
19	nC28	0,30	0,05	0,51	0,09	tr		0,28	0,06
20	3,11-;3,9-;3,7-diMeC27	2,49	1,61	4,17	0,32	tr		2,28	0,56
21	Xi-MeC28:1	tr		0,54	0,06	0,58	0,06	0,41	0,06
22	14-,13-,12-,11-,10-MeC28	3,04	0,32	3,31	0,14	3,12	0,14	3,17	0,11
23	6-MeC28	0,15	0,03	0,32	0,02	0,42	0,03	0,31	0,03
24	4-MeC28	tr		0,37	0,02	tr		0,15	0,04
25	5,19-;5,14-diMeC28	0,40	0,17	0,26	0,02	1,75	0,16	0,81	0,16
26	8,14-diMeC28	0,39	0,12	tr		0,61	0,23	0,31	0,10
27	3-MeC28	0,45	0,16	0,19	0,01	tr		0,19	0,05
28	6,14-diMeC28	tr		tr		tr		tr	
29	4,12-diMeC28	0,10	0,10	tr		tr		tr	
30	nC29	0,71	0,17	3,71	0,78	1,09	0,07	2,01	0,42
31	Xi-MeC29:1	tr		26,71	1,17	2,08	0,36	11,18	2,70
32	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	39,07	5,94	29,96	0,67	19,29	1,24	28,62	2,24
33	5-MeC29	tr		0,13	0,01	tr		tr	
34	diMeC29:1	3,72	2,94	tr		4,54	1,43	2,55	0,97
35	11,15-;9,13-;9,15-diMeC29	4,32	1,93	2,85	0,30	5,27	1,07	4,08	0,64
36	3-MeC29	4,89	0,57	5,26	0,93	5,96	1,46	5,41	0,62
37	5,11-;5,15-diMeC29	0,79	0,16	0,44	0,03	tr		0,38	0,08
38	nC30	tr		0,15	0,02	tr		tr	
39	3,11-diMeC29	0,48	0,20	1,51	0,21	tr		0,72	0,17
40	Xi-MeC30:1	tr		0,48	0,06	tr		0,20	0,05
41	15-,14-,13-,12-,11-,10-MeC30	0,78	0,19	1,71	0,13	1,01	0,09	1,23	0,11
42	Xi-MeC31:1	tr		2,78	0,39	tr		1,09	0,32
43	15-,13-,11-,9-MeC31	2,78	0,78	2,55	0,17	1,77	0,18	2,34	0,23
44	7-MeC31	tr		tr		0,11	0,02	tr	
45	13,19-;11,19-;11,15-diMeC31	0,63	0,29	tr		tr		0,17	0,09
46	13,17-diMeC31	tr		0,16	0,04	tr		tr	
47	9,21-diMeC31	tr		0,26	0,03	tr		0,10	0,03
48	7,19-diMeC31	tr		0,27	0,04	tr		0,10	0,03
49	7,15-diMeC31	tr		tr		0,82	0,10	0,29	0,09
50	nC32	tr		tr		tr		tr	
51	17-,15-,13-,11-MeC33	tr		tr		0,71	0,09	0,71	0,05
52	13,17-diMeC33	tr		tr		tr		tr	
53	11,21-diMeC33	tr		tr		0,45	0,04	0,45	0,03
54	13,23-diMeC35	tr		tr		0,38	0,05	0,38	0,03

Tableau 3b.7C: Pourcentages des HCs de la PPG des 3 colonies de *P. subversa*

classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=5, 8 et 6 respectivement).

HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

N°	Hydrocarbures	Ps24		Ps20		Ps32		<i>P. subversa</i>	
		Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
1	nC23	tr		tr		tr		tr	
2	11-,9-,7-MeC23	0,19	0,04	tr		tr		tr	
3	5-MeC23	0,17	0,03	tr		tr		0,11	0,02
4	3-MeC23	tr		tr		tr		tr	
5	7,15-diMeC23	0,11	0,01	tr		tr		tr	
6	5,11-diMeC23	0,16	0,02	0,18	0,06	0,14	0,01	0,16	0,03
7	5,15-diMeC23	0,26	0,03	0,16	0,04	0,21	0,02	0,20	0,02
8	5,17-diMeC23	0,19	0,03	0,11	0,02	0,13	0,01	0,14	0,01
9	nC24	0,18	0,06	tr		0,10	0,05	0,12	0,02
10	3,7-diMeC23	tr		tr		tr		tr	
11	5,11,15-triMeC23	tr		tr		tr		tr	
12	5,9,17-triMeC23	tr		tr		tr		tr	
13	12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC24	0,46	0,03	0,78	0,37	0,31	0,02	0,55	0,16
14	6-MeC24	0,33	0,03	0,25	0,04	0,24	0,02	0,27	0,02
15	5-MeC24	0,11	0,01	tr		tr		tr	
16	4-,2-MeC24	0,15	0,01	0,19	0,05	tr		0,15	0,02
17	3-MeC24	tr		0,22	0,10	tr		0,12	0,05
18	6,12-diMeC24	tr		tr		tr		0,06	0,01
19	5,15-diMeC24	0,34	0,03	0,32	0,03	0,32	0,03	0,32	0,02
20	nC25	7,11	2,11	3,99	0,49	2,48	0,23	4,33	0,69
21	15-,13-,11-,9-MeC25	12,83	1,22	10,41	1,29	11,40	0,86	11,36	0,69
22	7-MeC25	5,17	0,38	4,25	0,43	3,72	0,30	4,33	0,25
23	5-MeC25	9,88	0,54	8,78	0,46	7,36	0,77	8,62	0,39
24	3-MeC25	6,68	0,77	10,30	1,12	4,81	0,64	7,61	0,77
25	5,19-,5,17-,5,15-,5,13-diMeC25	39,87	1,34	41,88	1,00	48,10	1,96	43,32	1,11
26	3,17-,3,15-,3,13-diMeC25	2,50	0,12	2,38	0,24	2,90	0,18	2,57	0,13
27	5,13,17-triMeC25	0,92	0,06	1,33	0,10	1,47	0,09	1,27	0,07
28	13-,12-,11-,10-,9-,8-,7-MeC26	0,80	0,07	0,67	0,06	0,72	0,06	0,72	0,04
29	6-,5-MeC26	0,44	0,04	0,39	0,03	0,42	0,04	0,41	0,02
30	4-,2-MeC26	tr		0,13	0,02	tr		tr	
31	3-MeC26	tr		tr		tr		tr	
32	6, 14-diMeC26	0,22	0,02	0,29	0,03	0,26	0,03	0,26	0,02
33	6,18-,5,17-diMeC26	0,58	0,03	0,57	0,04	0,65	0,05	0,60	0,02
34	4,18-,4,16-,4,14-diMeC26	0,37	0,03	0,44	0,03	0,51	0,06	0,44	0,03
35	nC27	0,60	0,36	0,60	0,22	0,24	0,08	0,48	0,13
36	3,15-,3,13-diMeC26	tr		tr		tr		tr	
37	13-,11-,9-,7-MeC27	1,67	0,12	2,29	0,45	1,72	0,20	1,95	0,21
38	5-MeC27	0,28	0,04	0,59	0,30	0,27	0,06	0,41	0,13
39	3-MeC27	0,32	0,11	0,70	0,20	0,31	0,07	0,48	0,10
40	5,19-,5,17-,5,15-,5,13-diMeC27	2,33	0,11	3,84	1,09	3,55	0,53	3,35	0,49
41	nC28	tr		tr		tr		tr	
42	3,19-,3,17-,3,15-diMeC27	0,21	0,04	0,24	0,04	0,25	0,03	0,24	0,02
43	5,15,17-triMeC27	tr		tr		0,13	0,07	tr	
44	5,9,17-triMeC27	tr		tr		tr		tr	
45	nC29	0,22	0,15	0,13	0,04	tr		0,14	0,04
46	15-,13-,11-,9-,7-MeC29	tr		0,65	0,25	0,13	0,03	0,34	0,12
47	3-MeC29	tr		tr		tr		tr	
48	5,17-diMeC29	tr		1,15	1,03	0,15	0,05	0,53	0,44
49	15-,13-,11-,9-MeC31	tr		tr		tr		tr	
50	13,19-,11,19-,11,15-diMeC31	tr		tr		tr		tr	
51	7,19-diMeC31	tr		tr		tr		tr	
52	nC32	tr		tr		tr		tr	
53	11,21-diMeC33	tr		tr		tr		tr	
54	12,22-diMeC34	tr		tr		tr		tr	
55	17-,15-,13-MeC35	0,14	0,02	tr		tr		tr	
56	13,23-diMeC35	2,29	0,13	0,56	0,33	2,87	0,44	1,74	0,31
57	13,23-diMeC36	tr		tr		0,21	0,04	tr	
58	19-,17-,15-,13-MeC37	tr		tr		0,18	0,03	tr	
59	13,25-,15,23-diMeC37	1,21	0,10	0,34	0,24	2,14	0,39	1,13	0,24
60	13,25-,15,25-diMeC38	tr		tr		tr		tr	
61	13,25-,13,23-diMeC39	tr		tr		0,30	0,07	0,30	0,04

Tableau 3b.8A: Comparaison des HCs majoritaires (>2%) de la cuticule (CT) et de la PPG (PG) des 3 colonies de *P. villosa* classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=6, 6, 7, 7, 9 et 9 respectivement); HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

Hydrocarbures	CT-Pv 3		PG-Pv3		CT-Pv 6		PG-Pv6		CT-Pv 21		PG-Pv21		CT- <i>P. villosa</i>		PG- <i>P. villosa</i>	
	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
2-MeC28	3,36	0,87	tr		1,60	0,32	tr		1,97	0,50	tr		2,23	0,35	tr	
nC29	1,46	0,37	tr		0,72	0,17	tr		2,50	0,61	tr		1,65	0,31	tr	
3-MeC29	7,94	1,63	tr		5,07	0,76	tr		9,66	1,17	tr		7,73	0,79	tr	
2-MeC30	4,75	1,14	tr		3,45	1,02	tr		3,90	0,52	tr		3,99	0,48	tr	
17-,15-,13-MeC35	tr		2,04	0,18	tr		2,94	0,16	tr		1,58	0,12	tr		2,14	0,15
13,19-;13,17-diMeC35	8,18	1,40	15,82	2,47	7,81	0,58	19,09	1,06	4,15	0,71	13,51	0,61	6,42	0,64	15,91	0,91
14,18-;12,16-diMeC36	tr		2,27	0,12	tr		3,31	0,07	tr		2,62	0,09	tr		2,74	0,10
Xi-MeC37:1	3,55	0,28	2,53	0,45	0,66	0,08	3,50	0,31	tr		2,60	0,26	1,18	0,33	2,86	0,20
19-,17-,15-,13-MeC37	5,95	0,42	4,07	0,61	4,32	0,34	5,56	0,73	5,92	0,51	4,55	0,71	5,42	0,30	4,74	0,41
15,19-;13,17-diMeC37	38,81	4,80	50,09	3,01	65,42	3,10	42,20	1,44	56,94	4,98	53,49	2,65	54,69	3,37	48,97	1,73
Xi-MeC39:1	2,69	0,69	tr		0,52	0,13	tr						0,90	0,30	tr	
19-,17-,15-,14-,13-MeC39	4,51	0,82	2,82	0,48	1,75	0,33	2,90	0,20	3,03	0,65	2,55	0,24	3,03	0,42	2,73	0,17
13,19-diMeC39	9,79	1,36	8,17	0,72	4,47	0,71	7,26	0,22	8,26	1,11	8,65	0,28	7,47	0,76	8,08	0,26
TOTAL	91,01		87,80		95,79		86,76		96,32		89,55		94,70		88,18	

Tableau 3b.8B: Comparaison des HCs majoritaires (>2%) de la cuticule (CT) et de la PPG (PG) des 3 colonies de *P. inversa* classés par temps de rétention (moyenne \pm e.s., n=6, 6, 10, 9, 8 et 8 respectivement); HCs en gras : >2%; trace (tr) : <0,1%.

Hydrocarbures	CT-Pi 4		PG-Pi4		CT-Pi 11		PG-Pi11		CT-PiA 63		PG-PiA63		CT- <i>P. inversa</i>		PG- <i>P. inversa</i>	
	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
nC27	16,87	1,94	tr		19,36	1,43	tr		28,75	2,87	tr		21,87	1,56	tr	
13-,11-,9-,7-MeC27	18,62	3,93	19,60	5,39	2,32	0,23	4,01	0,29	24,49	1,91	30,40	1,24	13,78	2,35	17,26	2,80
9,13-;11,15-diMeC27	tr		2,50	0,36	tr		1,27	0,08	tr		4,72	0,44	tr		2,79	0,36
3-MeC27	14,60	2,59	9,21	2,01	8,03	1,03	2,50	0,30	19,75	1,78	11,35	1,54	13,58	1,41	7,33	1,11
nC28	2,51	0,37	tr		4,59	0,21	tr		1,73	0,19	tr		3,12	0,30	tr	
3,11-;3,9-;3,7-diMeC27	tr		2,49	1,61	tr		4,17	0,32			tr		tr		2,28	0,56
14-,13-,12-,11-,10-MeC28	2,18	0,21	3,04	0,32	1,50	0,12	3,31	0,14	1,24	0,22	3,12	0,14	1,58	0,12	3,17	0,11
4-,2-MeC28	0,72	0,21	tr		0,95	0,08	tr		2,03	0,29	tr		1,25	0,16	tr	
nC29:1					2,09	0,08	tr						0,87	0,22	tr	
nC29	4,11	1,03	0,71	0,17	15,58	1,58	3,71	0,78	3,26	0,20	1,09	0,07	8,61	1,41	2,01	0,42
11-,15-, et Xi-MeC29:1	1,39	0,89			13,83	1,00	26,71	1,17	1,00	0,27	2,08	0,36	6,44	1,38	11,18	2,70
15-,13-,11-,9-,7-MeC29	24,80	2,87	39,07	5,94	12,74	0,95	29,96	0,67	8,82	0,91	19,29	1,24	14,45	1,53	28,62	2,24
diMeC29:1	tr		3,72	2,94					tr		4,54	1,43	tr		2,55	0,97
11,15-;9,13-;9,15-diMeC29	tr		4,32	1,93	tr		2,85	0,30	tr		5,27	1,07	tr		4,08	0,64
3-MeC29	5,32	0,82	4,89	0,57	8,31	1,00	5,26	0,93	3,02	0,40	5,96	1,46	5,80	0,67	5,41	0,62
Xi-MeC31:1					tr		2,78	0,39					tr		1,09	0,32
15-,13-,11-,9-MeC31	tr		2,78	0,78	tr		2,55	0,17	tr		1,77	0,18	tr		2,34	0,23
TOTAL	91,13		92,34		89,29		89,08		94,08		89,59		91,35		90,11	

Tableau 3b.8C: Comparaison des HCs **majoritaires** (>2%) de la **cuticule (CT)** et de la **PPG (PG)** des 3 colonies de *P. subversa* classés par temps de rétention (moyenne ± e.s., n=6, 6, 10, 9, 8 et 8 respectivement); **HCs en gras** : >2%; trace (tr) : <0,1%.

Hydrocarbures	CT-Ps24		PG-Ps24		CT-Ps20		PG-Ps20		CT-Ps32		PG-Ps32		CT- <i>P. subversa</i>		PG- <i>P. subversa</i>	
	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.
nC25	27,43	1,55	7,11	2,11	10,75	2,24	3,99	0,49	15,00	2,02	2,48	0,23	16,48	1,97	4,33	0,69
15-,13-,11-,9-MeC25	7,59	0,68	12,83	1,22	3,87	0,70	10,41	1,29	7,15	1,02	11,40	0,86	5,88	0,60	11,36	0,69
7-MeC25	4,14	0,37	5,17	0,38	2,46	0,35	4,25	0,43	4,30	0,35	3,72	0,30	3,48	0,29	4,33	0,25
5-MeC25	10,95	0,41	9,88	0,54	11,96	0,97	8,78	0,46	9,92	1,07	7,36	0,77	11,05	0,56	8,62	0,39
3-MeC25	18,80	1,43	6,68	0,77	26,48	1,86	10,30	1,12	17,07	1,43	4,81	0,64	21,49	1,38	7,61	0,77
5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC25	25,26	1,54	39,87	1,34	34,99	2,82	41,88	1,00	32,52	3,47	48,10	1,96	31,65	1,84	43,32	1,11
3,17-;3,15-;3,13-diMeC25	tr		2,50	0,12	tr		2,38	0,24	tr		2,90	0,18	tr		2,57	0,13
13-,11-,9-,7-MeC27	tr		1,67	0,12	tr		2,29	0,45	tr		1,72	0,20	tr		1,95	0,21
5,19-;5,17-;5,15-;5,13-diMeC27	tr		2,33	0,11	tr		3,84	1,09	tr		3,55	0,53	tr		3,35	0,49
13,23-diMeC35	tr		2,29	0,13	tr		0,56	0,33	tr		2,87	0,44	tr		1,74	0,31
13,25-;15,23-diMeC37	tr		1,21	0,10	tr		0,34	0,24	tr		2,14	0,39	tr		1,13	0,24
TOTAL	94,16		91,54		90,51		89,01		85,97		91,06		90,03		90,32	

Annexe 3c

Quantification des hydrocarbures

La quantité des HCs a été déterminée à partir de la surface des aires de chacun des pics issus de la GC-MS rapportée à celle des standards internes. Seule l'espèce Pv présente une différence significative entre la quantité d'HCs de la cuticule et celle de la PPG correspondante avec un rapport d'environ 3,5 fois plus d'HCs dans la PPG (Fig. 3c.1 et Tab. 3c.1). La quantité d'HCs de la cuticule et de la PPG de Pv est significativement différente de celle de Pi mais pas de celle de Ps. Les quantités de Ps sont intermédiaires entre celles de Pi et de Pv ($P > 0,05$). Pour les quantités de la PPG, Pv est significativement différente des 2 autres espèces (Fig. 3c.1 et Tab. 3c.1).

La comparaison des quantités d'HCs au niveau des colonies montre que toutes les colonies, sauf Pi11 et Ps24, présentent plus d'HCs dans la PPG que sur la cuticule même si toutes les différences ne sont pas significatives (Fig. 3c.2 et Tab. 3c.2). Les pertes occasionnées par la dissection des PPG rendent difficile toute quantification précise de leurs HCs. Par contre, les valeurs obtenues représentent obligatoirement la quantité minimum contenue dans ces glandes.

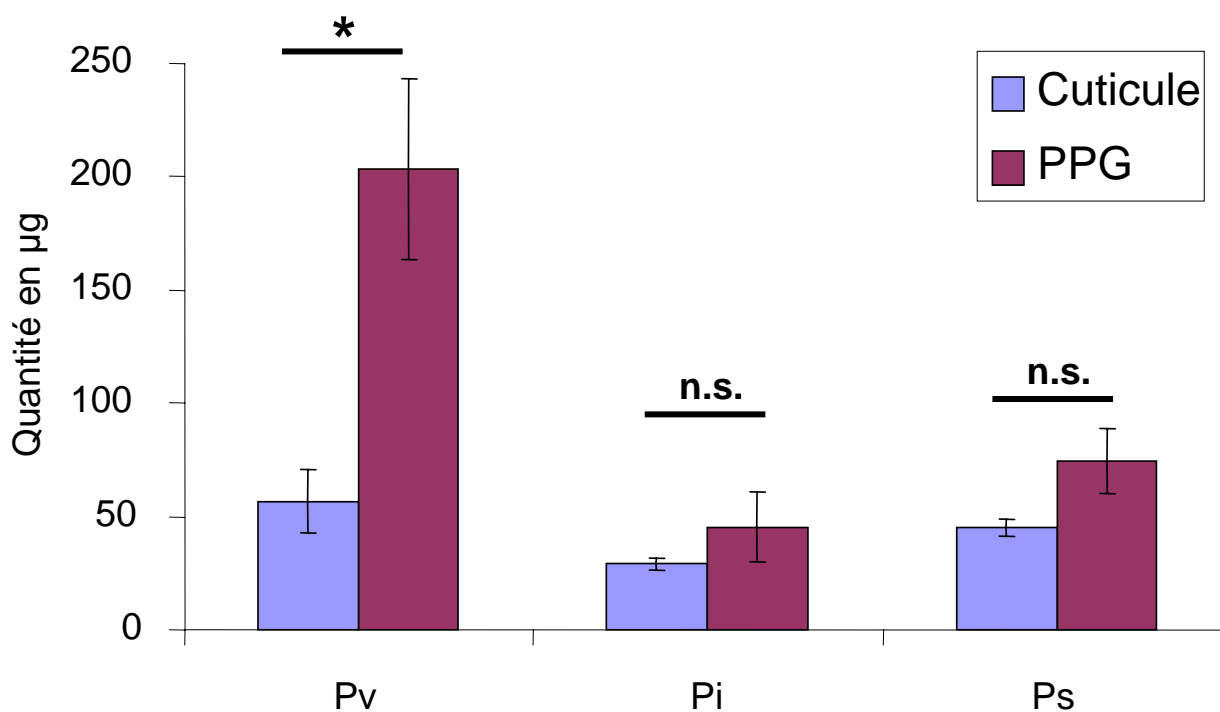


Figure 3c.1: Quantité des HCs de la cuticule et de la PPG des 3 espèces Pv, Pi et Ps (n=18, 22 et 16 respectivement). Moyenne (en µg) ± E.S., n.s.: non significatif, *: p<0,05.

Tableau 3c.1: Quantité des HCs de la cuticule et de la PPG des 3 espèces Pv, Pi et Ps (n=18, 22 et 16 respectivement). Moyenne (en µg) ± E.S., en rouge: différence significative (p<0,05).

Espèces	Cuticule		PPG		Probabilité
	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	
Pv	56,63	13,95	203,29	39,90	0,0002
Pi	29,10	2,75	45,53	15,61	0,7521
Ps	45,30	3,52	74,49	14,52	0,2913

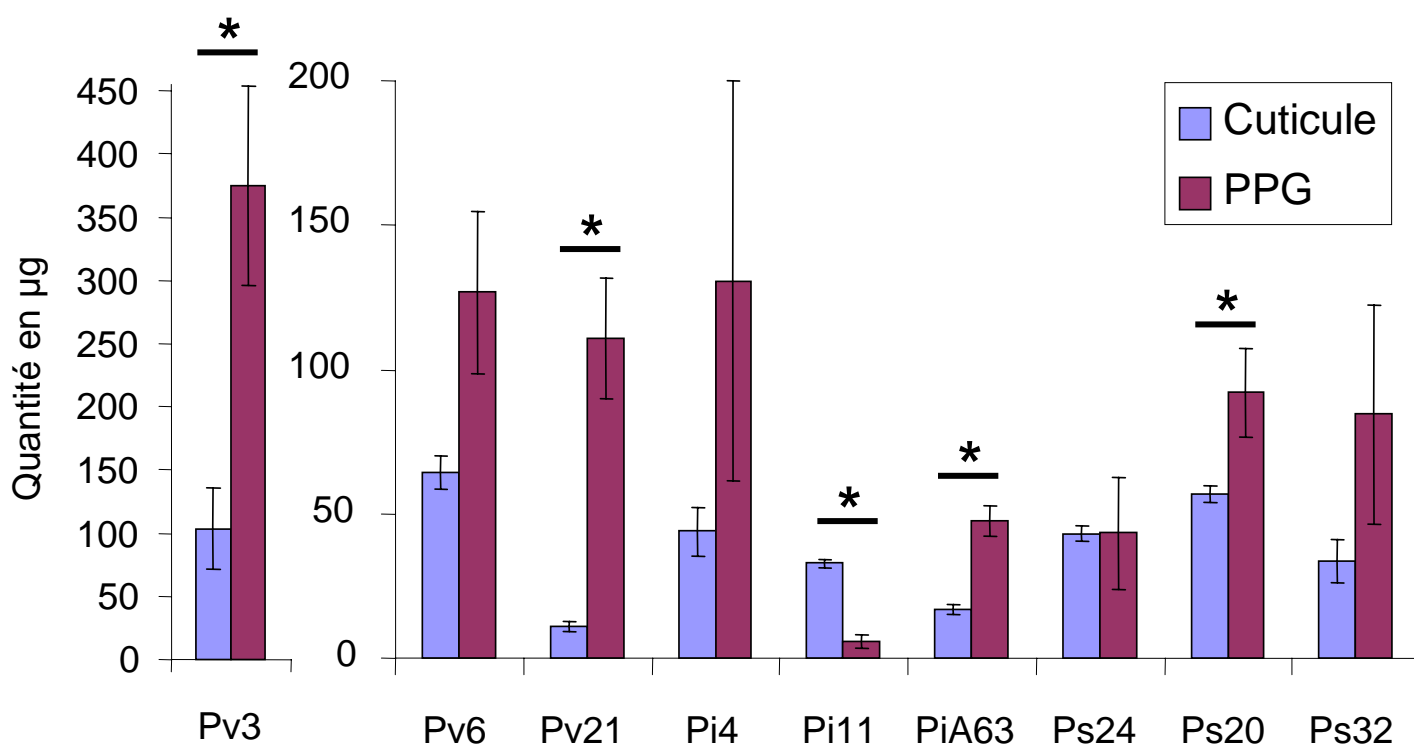


Figure 3c.2: Quantité des HCs de la cuticule et de la PPG de 9 colonies des 3 espèces. Moyenne (en µg) ± E.S., *: $p < 0,05$, $n = 5-10$.

Tableau 3c.2: Quantité des HCs de la cuticule et de la PPG des 3 espèces. Moyenne (en µg) ± E.S., en rouge: différence significative ($p < 0,05$), $n = 5-10$.

Colonies	Cuticule		PPG		Probabilité
	Moy.	E.S.	Moy.	E.S.	
Pv3	103,67	31,94	375,27	78,79	0,0104
Pv6	64,15	5,86	126,68	28,12	0,2506
Pv21	10,93	1,60	110,61	20,84	0,0017
Pi4	43,78	8,68	130,65	69,11	0,3865
Pi11	32,97	1,50	5,81	2,09	0,0002
Pi63	16,92	1,81	47,65	5,19	0,0008
Ps24	43,18	2,37	43,32	19,29	0,1171
Ps20	56,75	2,87	92,06	15,44	0,0163
Ps32	33,68	7,50	84,58	37,95	0,6015

CHAPITRE IV

Chapitre IV: Circulation des hydrocarbures et homogénéisation de l'odeur coloniale à l'échelle du groupe

Résumé de l'article 4

La circulation interne et externe (entre individus) des hydrocarbures (HC) a été étudiée chez des ouvrières de l'espèce *Pachycondyla apicalis* à l'aide de marqueurs radioactifs. Les HCs nouvellement synthétisés sont apparus à la fois dans la glande postpharyngienne (PPG) et sur la cuticule en quantité non négligeable et dans le jabot en quantité moins importante. La quantité d'HC radioactifs contenus dans les brosses frontales basitarsales est supérieure à la quantité théorique calculée à partir de leur surface cuticulaire totale. Ceci suggère une excrétion préférentielle des HCs au niveau des brosses. Nous supposons que les HCs néosynthétisés sont tout d'abord sécrétés au niveau des brosses frontales basitarsales puis sont soit redistribués sur l'ensemble de la surface corporelle soit éliminés via la PPG par le canal alimentaire.

Nous avons suivi l'évolution de la circulation des lipides nouvellement synthétisés en injectant une ouvrière avec des précurseurs radioactifs de la chaîne de biosynthèse des HCs. 24 heures après l'injection, l'individu dit "donneur" a été réintégré dans son groupe d'origine constitué de 10 ouvrières. Les individus dits "receveurs" acquièrent progressivement les HCs radioactifs par le biais d'interactions sociales avec le "donneur". Au bout de 5 à 10 jours, l'homogénéisation de la radioactivité totale est atteinte. La courbe de transfert (traduisant la distribution et donc l'homogénéisation des HCs radioactifs) de *P. apicalis* est inférieure à celle de *Camponotus fellah* et *Aphenogaster senilis*, deux espèces plus évoluées. *P. apicalis* est caractérisée par un transfert passif par contacts corporels tandis que les deux autres espèces possèdent des comportements plus efficaces tels que la trophallaxie et/ou le léchage social (allogrooming) intensif. Nous pensons que le faible pourcentage de transfert observé pour *P. apicalis* est dû à cette différence comportementale. Enfin, nous discutons de l'impact du transfert des lipides cuticulaires et de la formation d'une odeur coloniale uniforme auxquels nous opposons l'existence idiosyncratique d'une composition spécifique à la caste.

ARTICLE 4

THE SIGNIFICANCE OF WITHIN-GROUP HYDROCARBONS DISTRIBUTION FOR WORKERS OF *PACHYCONDYLA APICALIS*

V. Soroker^{1*}, C. Lucas², T. Simon³, D. Fresneau⁴, J. L. Durand⁴ and A. Hefetz³

¹ *Department of Entomology, Institute for Plant Protection, Volcani Center, Beit Dagan 50250, Israel*

² *Mécanismes de communication, Université Paris Sud, CNRS-UMR 8620, 91405 Orsay Cedex, France*

³ *Department of Zoology, George S. Wise Faculty of Life Science, Tel Aviv University, Ramat Aviv 69978, Israel;*

⁴ *Laboratoire d'Ethologie Expérimentale et Comparée, Université Paris Nord, CNRS-FRE 2413, 93430 Villetaneuse, France.*

* To whom correspondence should be addressed: SOROKERV@AGRI.GOV.IL, Tel: 972-3-9683950; Fax: 972-3-9604180

ABSTRACT

Within and between individuals hydrocarbon (HC)-circulation was studied in *Pachycondyla apicalis* workers, using radioactive labeling. Newly synthesized HCs occurred both in the PPG and the epicuticle in appreciable amounts, with lesser quantities in the crop. The front basitarsal brush contained larger amount of radiolabeled HCs than predictable from its surface area, suggesting preferential secretion to these organs. We propose that the newly synthesized HCs are primarily secreted to the front basitarsal brushes and are thereafter distributed throughout the body surface, or cleared via the PPG and the alimentary canal.

Using labeled HCs as a model, we tracked time dependent dispersion of cuticular lipids among 11 workers, of which one was prelabeled for 24 hours. Distribution among the

recipients progressively became even, reaching near homogenization between 5-10 days. Compared to the mean transfer of *Camponotus fellah* or *Aphenogaster senilis*, that of *P. apicalis* was inferior. We attribute this low transfer percentage to the inefficacy of passive body contact characteristic of *P. apicalis*, as opposed to trophallaxis and/or allogrooming that typify the other two species. The impact of cuticular lipid transfer and formation of uniform colony odor as opposed to the maintenance of an idiosyncratic caste-specific composition is discussed.

Keywords: Colony odour, hydrocarbons, Pachycondyla apicalis

INTRODUCTION

It has long been postulated that nestmate recognition in populous societies relies on a uniform colony odor (Gestalt), rather than individual recognition through sharing recognition cues among nest members (Crozier & Dix 1979).

Colonial specificity of cuticular hydrocarbons (HCs) indicated that they may constitute the recognition labels in social insects (Vander Meer & Morel 1998), which was corroborated by direct experiments in several ant species (Lahav et al. 1999; Thomas *et al.* 1999; Wagner *et al.* 2000). Moreover, splitting colonies results in divergence of HC profiles of the two groups, probably because the flow of cues between the groups is interrupted (Boulay *et al.* 2000; Lahav *et al.* 2001; Lenoir *et al.* 2001). These changes in profile are often, but not always, accompanied with disruption in the recognition of original nestmates thus providing an experimental evidence for the gestalt model and the significance of cues exchange.

Studies with *Cataglyphis niger* have demonstrated that HCs are biosynthesized in the fat body and secreted to the blood where they are transported both to the postpharyngeal gland (PPG) and the epicuticle (Soroker & Hefetz 2000). It was further shown in a number of ant species that the newly synthesized HCs circulate between the cuticle and the (PPG), both within and between individuals (see Lenoir et al., 1999 for review). Recent findings in *C. niger* showed that the crop contains appreciable amounts of HCs that are congruent with that of the PPG (Soroker *et al.* 1998). These HCs originate from the PPG rather than being sequestered from the blood by the crop. It is hypothesized that HC-flow from the PPG to the gut provide a mechanism for clearing away surplus HCs (Soroker & Hefetz 2000).

Hydrocarbon circulation seems to be slightly different in the ponerine *Pachycondyla apicalis*. Workers *P. apicalis* possess a well-developed front basitarsal cuticular brush that they frequently pass through the mouth while grooming (Hefetz *et al.* 2001). Prevention of contact between the mouth and the brushes by mouth blocking or leg restraining caused an increase in brush hydrocarbon amount with a concomitant decline in PPG HCs, suggesting that in this species PPG-HCs originate mostly by sequestration from the basitarsal brushes.

Inter-individual hydrocarbon exchange between nestmates provides a major mechanism by which uniform colony odor can be obtained. The magnitude of these exchanges seems to be correlated to the mode of cue exchange. In species exercising trophallaxis transfer is intensive and rapid. Species that do not trophallax but exhibit intensive allogrooming i.e. *Aphenogaster senilis*, also exhibit moderate to high levels of transfer, whereas species that exhibit no trophallaxis and almost no allogrooming have rather low levels of interindividual HC transfer

(Lenoir *et al.* 1999; Soroker *et al.* 1995). Thus, in *Camponotus fellah* that exhibits high rates of transfer, the distribution of newly synthesized HCs among nestmates attained normality after 24 hours while in *A. senilis*, that show moderate rates of transfer normal, the process was much slower (Lenoir *et al.* 2001).

As many other ponerine ants, *P. apicalis* workers do not perform trophallaxis with nestmates, and allogrooming occurs at a relatively low frequency of 0.5% (Soroker *et al.*, 1995). Indeed, HC transfer in dyadic encounters is low and can be explained solely by physical contact followed by selfgrooming. Theoretically, this low amount of cue exchange should still be sufficient to update the gestalt colony odor in these relatively small size colonies, (*P. apicalis* is typically composed of less than 100 individuals). but it is also possible that odor homogeneity is never attained and that recognition in this species is based on individual odors (Crozier 1987). The objective of this study was to test whether inter-individual HC transfer results in odor homogenization in groups of *P. apicalis* ants, as well as to investigate the respective roles of the PPG and basitarsal brushes in this process.

MATERIAL AND METHODS

COLLECTION AND MAINTENANCE OF THE ANT COLONIES

Colonies of *P. apicalis* were collected from Petit Saut French Guyana (1 colony), from Bahia, Brazil (2 colonies), and from Los Tuxtlas, Mexico (1 colony). In the laboratory, the ants were kept under standard conditions: 24-28°C, 50% humidity and a photoperiod of 14:10 L/D, and fed three times a week with an identical diet of sugar water and a mixture of minced insects.

RADIOTRACER EXPERIMENTS

The partition of newly synthesized HCs in the various body parts of workers was assessed following injection of 1μCi [$1-^{14}\text{C}$] sodium acetate as described earlier (Soroker, et al., 1995). After 24 hours of incubation ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), individually dissected PPG and crops were immersed in 100 μl of pentane whereas epicuticular lipids were extracted from the front legs, separately from the thorax with the remaining two pairs of rear legs by immersing these organs in pentane for 5 minutes (100μl and 400 μl of pentane, respectively).

Hydrocarbon transfer between prelabeled donor and its 10 nestmates after 1, 3, 5 or 10 days was assessed as previously described (Lenoir et al., 2001). Extracts of PPG and cuticular lipids were performed as above and were stored at -20°C until analysis. HCs were separated by TLC and their radioactivity monitored by IP Autoradiography as described earlier (Soroker, et al., 1995). Transfer of labeled HCs was calculated as the percentage labeled HCs found in each recipient out of total labeled HCs found in the donor(s) and recipient(s) combined.

MORPHOMETRIC MEASUREMENTS

The total area of the front legs ($n=5$), including the basitarsal brushes, was estimated from scanning electron micrographs of individual prepared as described in (Hefetz *et al.* 2001). First we counted the number of hairs per μm^2 using a sample of 5 squares (ca 9000 μm^2 each) randomly selected throughout the brush. This was multiplied by the total surface of the tarsus divided by 2 (since the brush occurs only dorsally) assuming a cylinder, and by the average area of a single hair ($n=10$). To the area of the brush we added the area of the other leg parts assuming a hairless cylinder, to obtain the total area of the front legs.

Table 1. Distribution of newly synthesized HCs in various body parts of workers *Pachycondyla apicalis*.

Body part	Surface area (mm ²)	Radioactivity DPM/body part (mean \pm sem)	Radioactivity (DPM/mm ²)	Radioactivity (in %)
PPG	ND	2326 \pm 249.4	ND	35
Crop	ND	618 \pm 174.5	ND	9
Front legs (pair)	10.5	1033 \pm 142.8	98	15
Thorax + 2 rear leg-pairs	40.7	2491 \pm 355.7	61	41

Table 2. Interactions involving physical contacts and allogrooming among 11 workers *P. apicalis* housed as a group for 24 hours. Data are the sum of interactions observed during 24 bouts of 5 minutes of each hour (total of 24 observations).

Ant identity	Duration of interaction (min)	% Time	Index of dispersion
nm	16.1	13.4	0.31
tj	16.6	13.9	0.28
aj	10.7	8.9	0.42
tjaj	14.6	12.2	0.39
tjar	48.0	40.0	0.20
tb	22.2	18.5	0.40
ab	13.0	10.9	0.35
tbab	23.1	19.2	0.38
tr	12.5	10.4	0.25
ar	12.8	10.7	0.34
trar	21.5	17.9	0.26
Mean	19.2	16.0	0.32
SD	10.5	8.7	0.07

The areas of the middle and hind legs were calculated as hairless cylinder, while the thorax area was calculated considering it as a symmetric ellipsoid that revolves around its large axis (Lahav *et al.* 1998).

INTER-INDIVIDUAL INTERACTIONS

To assess the total and distribution of inter-individual contacts in a group of workers, 11 individually marked workers (each ant received a letters code, Table 2) were videotaped during consecutive 24 hrs. Detailed measurements of contact durations were conducted for 5 minutes of every hour, for a total of 120 minutes over the 24 hours. The index of interaction dispersion among individuals interaction was calculated as described in statistical analyses.

STATISTICAL ANALYSES

Homogeneity of transfer newly synthesized HCs-distribution among the recipient group-mates was assessed by measuring an index of inequality in radioactive HCs repartition among the recipients. This index constitutes values between 0-1 and is calculated using the quadratic concentration rate (qcr) (Durand 1998):

$$qcr = \frac{s}{T} \sqrt{N}$$

where N is the number of recipient ants in the group; T is the total of radioactive found on the recipients, x is the amount of radioactive HCs in an individual ant, and s is the standard deviation :

$$s = \frac{\sqrt{\sum (x - Mean)^2}}{N - 1}.$$

The index is 0 when there is a uniform distribution among nestmates, and 1 when there is complete inequality in distribution i.e., transfer was to only one recipient.

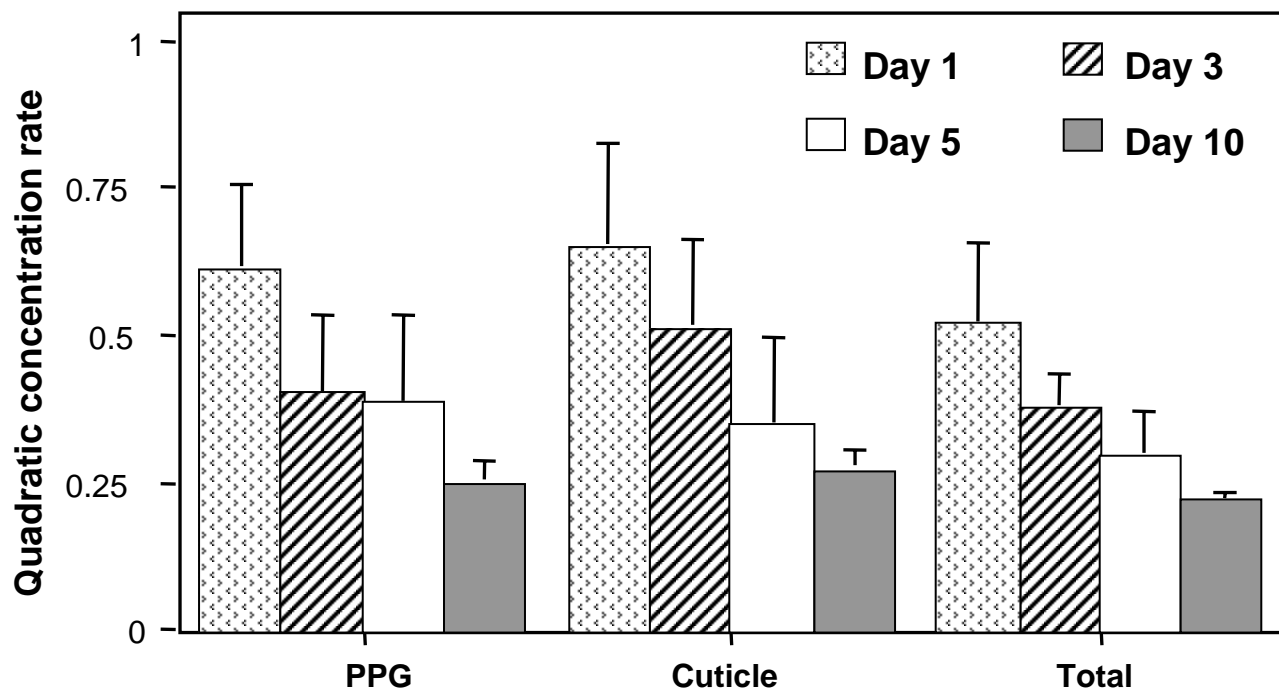


Figure 1. The distribution of newly synthesized hydrocarbons (expressed as index of inequality repartition, see text) among 10 workers *P. apicalis* housed together for various time lengths.

RESULTS

BIOSYNTHESIS

HCs distribution in various body parts of individual workers 24 hours post-injection is shown in Table 1. Appreciable amounts of newly synthesized HCs are found in the PPG and only small amounts in the crop. Most interesting was the distribution of cuticular HCs. The front legs had about 1.5 times more radioactivity per unit surface-area than in the thorax and the 2 rear pair of legs combined.

GROUP TRANSFER

Figure 1 shows the index of intra-group dispersion of newly synthesized HCs after 1, 3, 5, and 10 days, respectively. This index has values between 0 and 1; Lower index values indicate better dispersion of the newly synthesized HCs. As can be seen from the figure there was a gradual decrease in the index as time progressed both for the cuticle and the PPG, indicating that dispersion of HCs within the group of 10 ants becomes progressively more even. After 10 days the index reached 0.25 ± 0.04 and 0.27 ± 0.04 for the PPG and cuticle, respectively.

Assuming a homogeneous distribution within the group of 11 individuals, it is predicted that each individual will possess about 9% of total radioactivity. Considering that the PPG contains 35% and the cuticle 56% of total newly synthesized HCs per ant, each ant should theoretically possess about 3% and 6% in its PPG and cuticle, respectively. This prediction was met for the PPG that reached the expected 3% after 10 days, but not for the cuticle that showed only about 2%.

WITHIN-GROUP BEHAVIORAL INTERACTIONS

The duration and percent of time that each ant spent in contact with other ants are shown in Table 2. Except for one extraordinary ant, most ants spent between 9-19% of their time in contact with their nestmates. The index of dispersion, i.e., an index of contact frequencies of the different ants, was rather low (between 0.25 – 0.42; Table 2) indicating that contacts were spread more or less evenly between the different ants. The exceptional ant (tjar in Table 2) was one that has recently started to lay eggs (out of the total of four egg laying workers that were observed (nm, tr, ar, aj) in the group. It was the center of attention receiving extensive allogrooming (70% of her total contact time) from 7 of her nestmates.

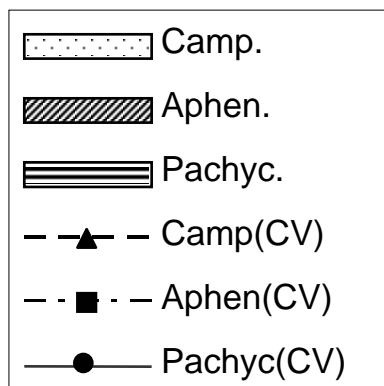
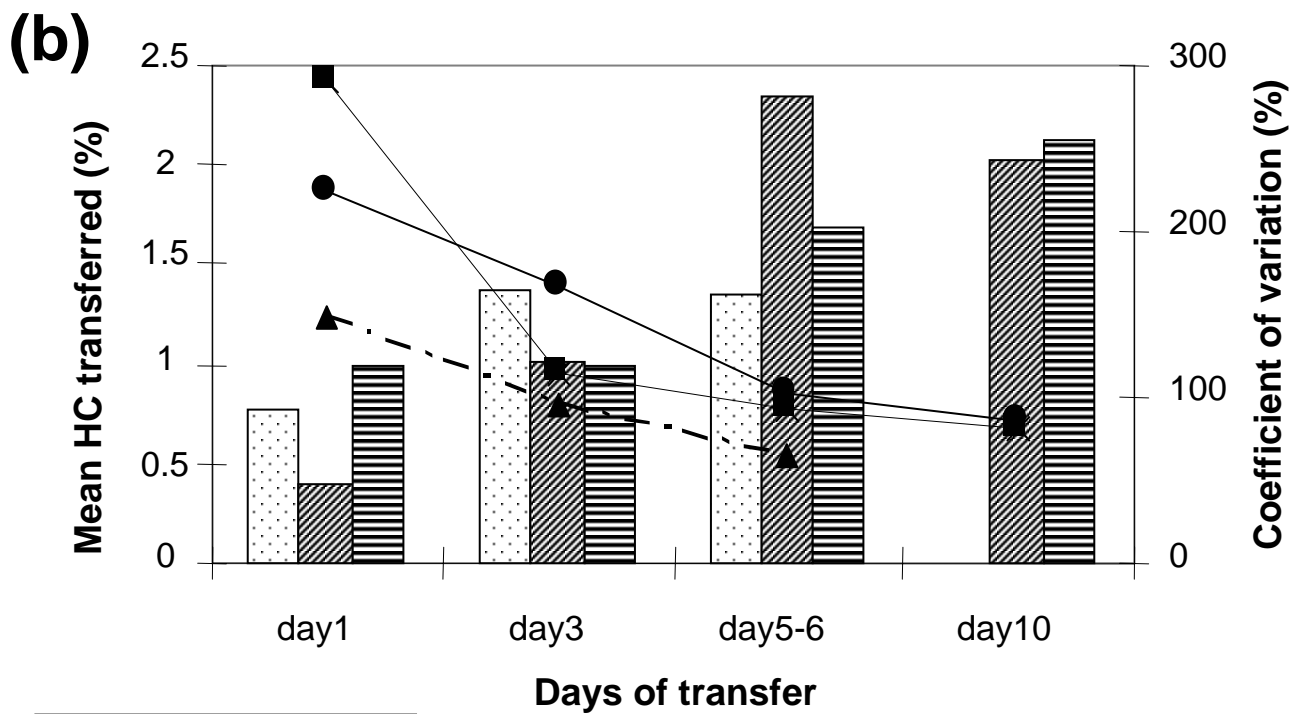
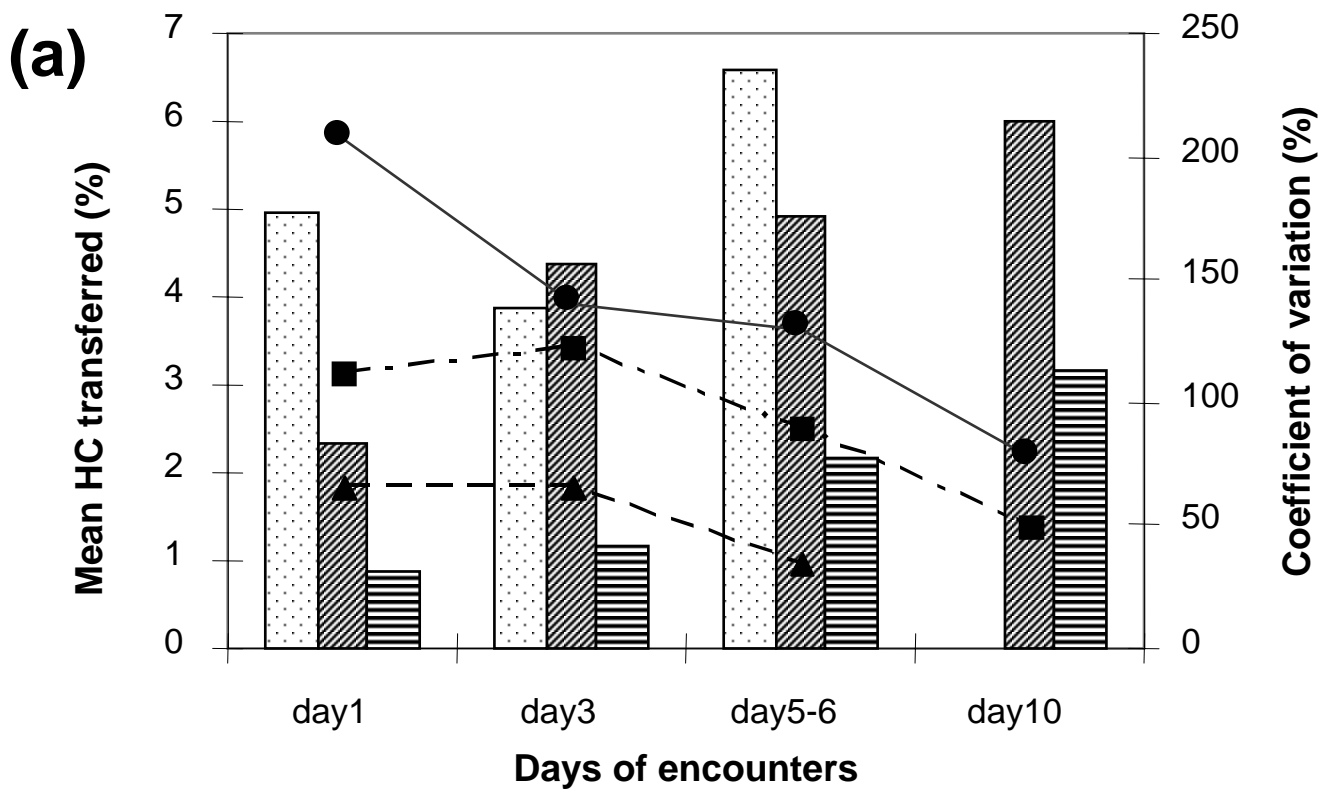


Figure 2. Comparison between species: **(a)** HC distribution in the PPG, **(b)** HC distribution on the cuticle of the different species.

COMPARATIVE ANALYSIS OF TRANSFER DYNAMIC

Figure 2 shows a comparative analysis of mean transfer rates (bar graph) and its Coefficient of Variance (line graph) in three species with different behaviors. *P. apicalis* has relatively small colonies, do not trophallax and performs little allogrooming; *A. senilis* comprises populous colonies, do not trophallax, but performs intensive allogrooming; *C. fellah* comprises populous colonies, and practices both intensive trophallaxis and allogrooming.

In all species the mean HCs-transfer to the PPG increased with time while the Coefficient of Variance decreased, but at different rates. Workers of *C. fellah* showed the highest transfer rate and the lower Coefficient of Variance. Conversely, the lowest rates and the highest variance characterized *P. apicalis*. Moreover, *C. fellah* reach almost the maximal value of transfer (9%) already by day 5, whereas in *P. apicalis* transfer did not surpass 3% even after 10 days. Both transfer rate and variance in *A. senilis* showed intermediate values. Transfer to the cuticle showed the same trends as that to the PPG, but was globally lower. Notwithstanding, transfer to the cuticle of *P. apicalis* was proportionally higher than in the other two species. Moreover, after 5 days of encounters, the variation in *P. apicalis* decreased to the level of other species.

DISCUSSION

The chemical basis of nestmate recognition in ponerine is little understood. It is assumed that, as in other species of ants (Lenoir *et al.* 1999; Vander Meer & Morel 1998), cuticular HCs are implicated. On the other hand there are numerous reports that indicate that either the complete hydrocarbon profile (Liebig *et al.* 2000) or some of its constituents (Peeters *et al.* 1999; Heinze *et al.*, 2002) act as fecundity signals or are involved in the establishment of dominance hierarchies. Whether disparate HCs are involved in each system or they interact in a complex manner is still unclear.

In the present study we examined the distribution of newly synthesized HCs in the ant *P. apicalis* and examined the dynamic of their distribution among nestmates in an attempt to simulate hydrocarbon passage within a nest.

One day after injection of the radioactive precursor considerable quantities of newly synthesized hydrocarbons were detected both on the cuticle and in the PPG. Particular accumulation was noted in the front tarsal brushes that possess about 50% more newly synthesized HC than any other cuticular part measured. This is consistent with the hypothesis that the front brushes play a major role in the dissipation of HC to other body parts (Hefetz *et al.* 2001). We can not tell at the moment whether the elevated radioactivity is the result of higher rates of HC secretion in the frontal brush, or preferential accumulation during selfgrooming. However, previous studies have shown that when the front brush are restrained so that they have no contact with other body parts, their HC content increases. This lends credence to the higher secretory rate hypothesis. Another organ that had considerable amount of radioactive HC was the PPG. Their origin may be from internal transport, but we suggest that the bulk comes from external sources. While grooming the ants extensively pass their front tarsal brushes through their mouth, possibly discharging HC into the PPG. The small amounts of radioactive HC that were found in the crop further suggest that they are eliminated from the PPG via the alimentary canal, as was also suggested for *C. niger* (Soroker & Hefetz 2000). Thus, we propose the following HC-circuit for *P. apicalis* workers. They are biosynthesized by the fat body or associated oenocytes and transported mostly to the cuticle, but also possibly to the PPG. The front basitarsal brushes are the site for preferential secretion, from which the HCs are distributed to other body surfaces through the extensive use of these brushes during selfgrooming. HCs turnover is achieved by selectively transporting them into the PPG and thereafter clearing them through the gut.

Whether or not HCs function as nestmate recognition cues, being cuticular components they may serve as a model for the behavior of recognition cues. Our study indicates that newly synthesized HCs are transferred between individuals, and that after 10 days every member of the group tested has received a share of these HCs. Thus, also in *P. apicalis* achieving a uniform colony odor through mutual cue exchange is possible. It is worthwhile noting that all the colonies experimented were queenless for several weeks. In *P. apicalis*, once stabilized as queenless group, there is no apparent overt conflict regarding dominance hierarchy, all interaction being amicable.

When we compare the dynamics and rate of cue distribution within the colony to other species, the impact of the mode of transfer becomes apparent (Fig 2 and Lenoir *et al.*, 2001). In *C. fellah*, due to extensive trophallaxis and allogrooming newly produced HCs are quickly disseminated throughout the nest with little variance between the receiving workers. Intermediate rates and variance are demonstrated for *A. senilis*. Behavioral observations in this species have shown very high rates of allogrooming that may compensate, in terms of HCs transfer, for the lack of trophallaxis. With this respect *P. apicalis* is inferior to both species, but nevertheless shows at the end of 10 days little variance among the recipient workers in the amount of hydrocarbon received. Since trophallaxis is non-existing in this species and allogrooming is rather sparse, we suggest that most of the transfer we observed is due to physical contacts and may be considered as passive transfer. Behavioral observations on groups of 11 ants during a 24 hrs period corroborate this idea. Although at some period particular ants had more contact with group-mates than did other ants, the overall index of interactions was similarly low for all the ants in the group. This indicates that physical contacts are more or less evenly distributed among nestmates.

The passage of chemicals between individuals may create a problem when caste specific signals are externalized and spread on the cuticular surface of the individual producing them (Sledge *et al.* 2001; Tenschert *et al.*, 2001). In the honey bee this problem was solved by creating a unique set of chemicals, the queen mandibular pheromone, that on the contrary is actively spread throughout the colony by the workers. Thus each worker carries the signals temporarily, but it is quickly eliminated either by allogrooming or metabolism (Naumann *et al.* 1991). This may also be the case in gamergates of the ponerine ant *Dinoponera quadriceps* that possess large quantities of (Z) 9-hentriacontene while workers have only minute amounts of this compound, albeit active transport of these compounds among workers was not reported (Peeters *et al.* 1999). An alternative way of using cuticular compounds to signal idiosyncrasy is to avoid contact with other nest members. This may be the case in *Harpegnathos saltator* (Liebig *et al.* 2000) or *Diacamma ceylonense* (Cuvillier-Hot *et al.* 2001). Avoidance of

contact bears also consequences on nestmate recognition system. If these species use cuticular HCs for nestmate recognition it implies that either the ants use individual recognition, or the gamergates are excluded from the recognition circle. Alternatively, recognition cues in these ants may be different from cuticular HCs, or that only part of the hydrocarbon profile is used for recognition (Kaib *et al.* 2000). In the latter case its composition must be rather constant over time or the ants have a good possibility to learn and memorize newly emerging odors.

Among ponerine ants, hydrocarbon transfer between individuals was so far investigated only in *P. apicalis*, making any generalization difficult. However, since within the confinement of the nest ants are always in contact it is not impossible that it represents a general phenomenon. Demands for efficient colony insularity together with the necessity to maintain social structure have undoubtedly selected for the evolution of various mechanisms of cue transfer. Selection would operate both on the behavioral modalities pertaining to cue transfer and the exocrine glands that may serve as gestalt organ to enable the adaptive manipulation of cues transfer-rates and cue-distribution among nestmates. Ponerine ants that show mostly primitive caste differentiation accompanied by developed hierarchical systems provide excellent study cases for testing these hypotheses.

ACKNOWLEDGEMENT

We wish to thank Antoine Pezon from the University of Paris Nord and Dr. Jorge Valeguala and Luiz Quiras from the Institute of Ecology, Mexico for helping in colonies collections under the collaboration program ECOS No. M99-B03. Jacques Delabie for his help in ant collection in Brazil under the collaborative program CAPES-COFECUB No. 520910/96-6. Marie-Clair Malherbe for conducting the scanning Electron micrographs of the front basitarsal brushes.

REFERENCES

- Boulay, R., Hefetz, A., Soroker, V. & Lenoir, A. 2000 *Camponotus fellah* colony integration: Worker individuality necessitates frequent hydrocarbon exchanges. *Anim. Behav.* 59: 1127-1133.
- Crozier, R. H. 1987 Genetic aspects of kin recognition: models for innate components of colony odor in social hymenoptera. In: *Kin Recognition in Animals* (Fletcher, D. J. C. & C. D. Michener, Eds), New York: John Wiley & Son. pp 55-73.
- Crozier, R. H. & Dix, M. W. 1979 Analysis of two genetic models for the innate components of colony odour in social Hymenoptera. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 4: 217-224.
- Cuvillier-Hot, V., Cobb, M., Malosse & Peeters, C. 2001. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J. of Insect Physiol.* 47: 485-493.
- Durand, J.-L. 1998, Taux de dispersion des valeurs propres en ACP, AC et ACM, *Mathématiques, Informatique et Sciences Humaines* 144:15-28.
- Hefetz, A., Soroker, V., Dahbi, A., Malherbe, M. C. & Fresneau, D. 2001. The front basitarsal brush in *Pachycondyla apicalis* and its role in hydrocarbon circulation. *Chemoecol.* 11: 17-24.
- Kaib, M., Eisermann, B., Schoeters, E., Billen, J., Franke, S. & Francke, W. 2000. Task-related variation of postpharyngeal and cuticular hydrocarbon compositions in the ant *Myrmecaria eumenoides*. *J. Compar. Physiol. a-Sensory Neural and Behavioral Physiol.* 186: 939-948.
- Lahav, S., Soroker, V., Hefetz, A. & Vander Meer, R. K. 1999. Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwiss* 86: 246-249.
- Lahav, S., Soroker, V., Vander Meer, R. K. & Hefetz, A. 1998. Nestmate Recognition in the Ant *Cataglyphis niger*: Do Queens Matter? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43: 203-212.
- Lahav, S., Soroker, V., Vander Meer R. K. & Hefetz, A 2001. Segregation of colony odor in the desert ant *Cataglyphis niger*. *J. of Chem. Ecol.* 27: 927-943.
- Lenoir, A., Cuisset, D. & Hefetz, A. 2001 Effects of social isolation on hydrocarbon pattern and nestmate recognition in the ant *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera, Formicidae). *Ins. Soc.* 48: 101-109.
- Lenoir, A., Fresneau, D., Errard, C. & Hefetz, A. 1999. Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. In: *Information Processing in Social insects* (Detrain C, Deneubourg, J. L. & J. M. Pasteels, Eds), Basel: Birkhauser Verlag. pp. 219-237

- Lenoir, A., Hefetz, A., Simon, T. & Soroker, V. 2001. Comparative dynamics of gestalt odour formation in two ant species *Camponotus fellah* and *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera: Formicidae). *Physiol. Entomol.* 26: 275-283.
- Liebig, J., Peeters, C., Oldham, N. J., Markstadter, C., & Holldobler, B. 2000. Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*? *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 97: 4124-4131.
- Naumann, K., Winston M. L., Slessor, K. N., Prestwich, G. D., & Webster, F. X. 1991. Production and transmission of honey bee queen (*Apis mellifera* L) mandibular gland pheromone. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 29:321-332.
- Peeters, C., Monnin, T. & Malosse, C. 1999. Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queenless Ant. *Proc. Royal Soc. London Series B-Biol. Sc.* 266:1323-1327.
- Sledge, M. F., Peeters, C. & Crewe, R. M. 2001. Reproductive division of labour without dominance interactions in the queenless ponerine ant *Pachycondyla* (= *Ophthalmopone*) *berthoudi*. *Insect. Soc.* 48: 67-73.
- Soroker, V., Fresneau, D. & Hefetz A 1998. Formation of colony odor in ponerine ant *Pachycondyla apicalis*. *J. Chem. Ecol.* 24:1077-1090.
- Soroker, V., Hefetz, A. 2000. Hydrocarbon site of synthesis and circulation in the desert ant *Cataglyphis niger*. *J. Insect Physiol.* 46: 1097-1102.
- Soroker, V., Vienne, C. & Hefetz, A. 1995 Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera, Formicidae). *J. Chem. Ecol.* 21: 365-378.
- Tenschert, J., Kolmer, K., Holldobler, B., Bestmann, H. J., Delabie, J.H.C. & Heinze, J. 2001. Chemical profiles, division of labor and social status in *Pachycondyla* queens (Hymenoptera: Formicidae). *Naturwiss.* 88: 175-178.
- Thomas, M. L., Parry L. J, Allan, R. A., Elgar, M. A. 1999. Geographic affinity, cuticular hydrocarbons and colony recognition in the Australian meat ant *Iridomyrmex purpureus*. *Naturwiss.* 86: 87-92.
- Vander Meer, R. K. & Morel, L. 1998. Nestmate recognition in ants. In: *Pheromone Communication in Social Insects. Ants, Wasps, Bees and Termites.* (Vander Meer, R., Breed, M., Winston, & M. K. Espelie, Eds.), Boulder, Colorado: Westview press, pp 79-103.
- Wagner, D., Tissot, M., Cuevas, W. & Gordon, D. M. 2000. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.* 26: 2245-2257.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion Générale

Nos résultats permettent de mieux cerner le processus de formation du "visa" colonial chez les Ponérines du genre *Pachycondyla*. Même s'il reste à mener une étude comparative plus poussée entre les 4 espèces étudiées on peut néanmoins émettre une hypothèse concernant le schéma de circulation "interne" et "externe" des HCs impliqués dans les mécanismes de reconnaissance des apparentés (Fig. 10). Les HCs nouvellement biosynthétisés, sont transportés par la Lp jusqu'à la cuticule et non à la PPG à moins de supposer l'existence d'un filtre à l'interface du système circulatoire et de la PPG. Les brosse basitarsales accumulent une grande quantité d'HCs qui seront récupérés par la PPG lors des toilettages individuels. Dans les 4 espèces de *Pachycondyla* étudiées qui possèdent une organisation sociale similaire sans trophallaxie et avec des taux de toilettage mutuel faibles, les HCs sont échangés par contacts corporels. La PPG va donc stocker les HCs cuticulaires de l'individu mais aussi ceux de ses congénères. Ces HCs seront ensuite redistribués sur toute la cuticule pour permettre à l'individu de réinitialiser son odeur coloniale. Le surplus de la PPG sera éliminé via le canal alimentaire vers le jabot. Enfin, les HCs seraient assimilés et transportés de nouveau par la Lp, de la même façon que les HCs alimentaires. Nous avons montré que chez *Pi* la PPG n'est pas un organe de biosynthèse d'HCs.

La PPG apparaît comme un intermédiaire indispensable pour la formation de l'odeur coloniale. Sachant que chez plusieurs espèces étudiées, les HCs de la PPG et de la cuticule induisent une réponse comportementale identique, si certains HCs sont absents de la PPG c'est qu'ils ne doivent pas être importants pour la reconnaissance coloniale. Les *n*-alcane et les MeA-Ext moins présents, voire absents, dans la composition hydrocarbonée de la PPG par rapport à celle de la cuticule, ne seraient donc pas porteurs d'informations coloniales. Ce qui est prouvé par nos tests comportementaux, au moins en ce qui concerne les *n*-alcane. En revanche, les HCs présents en proportion similaire sur la cuticule et dans la PPG sont de bons candidats pour être des marqueurs coloniaux. Ainsi, par comparaison un à un de la moyenne recalculée (c'est-à-dire sans tenir compte des *n*-alcane et des MeA-Ext) des HCs de la cuticule avec ceux de la PPG, on obtient la liste des HCs "stables". Pour que les HCs de cette liste soient considérés comme des marqueurs coloniaux, il faut que la moyenne des pourcentages de ces HCs soit différente d'une colonie à l'autre. Ces HCs "stables" et dont la moyenne est différente d'une colonie à l'autre sont donc les plus susceptibles de participer de

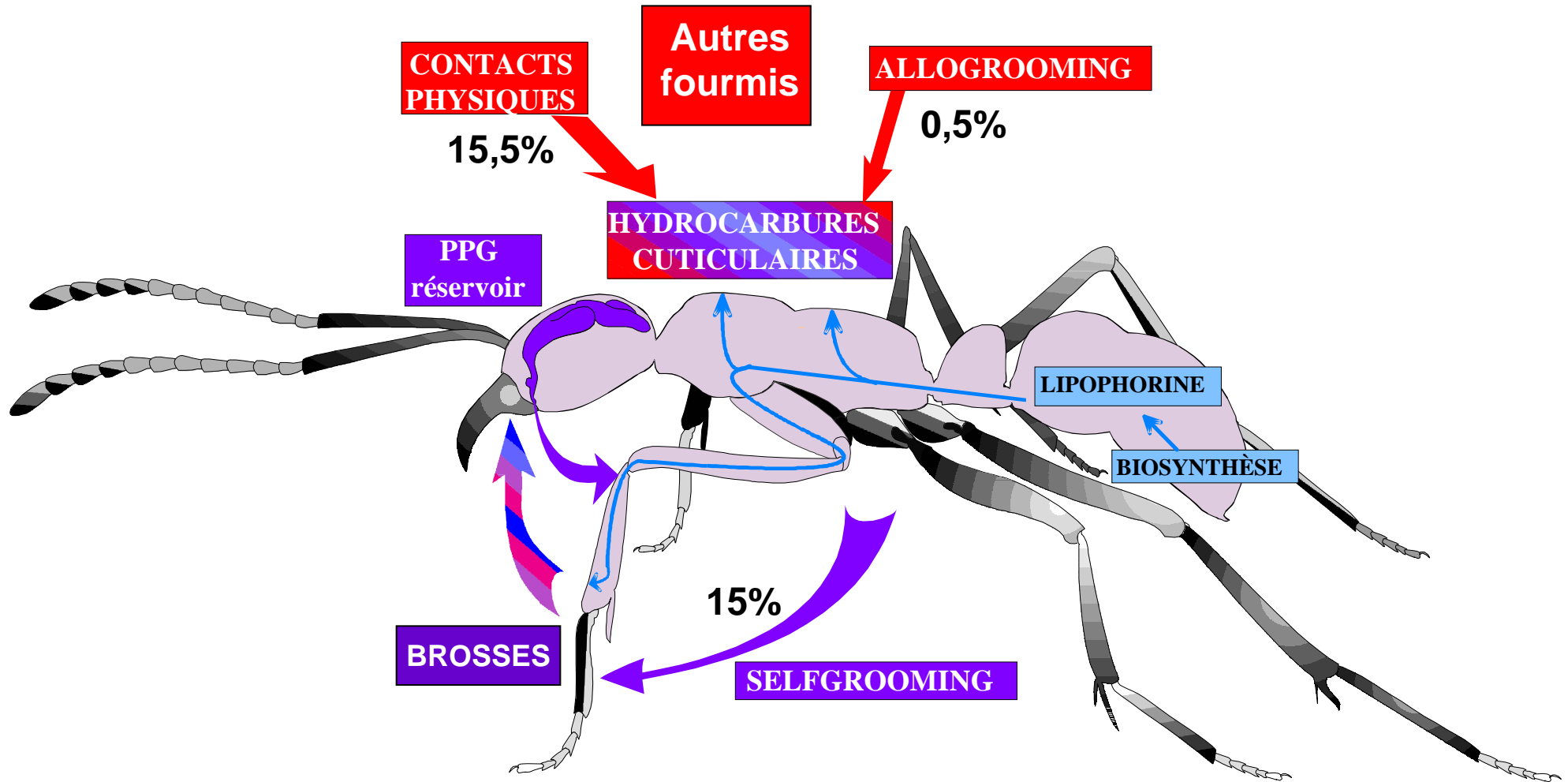


Figure 10: Schéma de circulation "interne" et "externe" des hydrocarbures chez les Ponérines. Les pourcentages indiqués représentent une estimation du temps d'activité réservé aux différents comportements impliqués dans cette circulation par rapport à l'activité totale d'une ouvrière chez *P. apicalis*.

façon prépondérante à la reconnaissance coloniale selon notre hypothèse de base. Le profil hydrocarboné cuticulaire de Pv présente une première partie constituée presque exclusivement de *n*-alcane et de MeA-Ext et une deuxième partie composée en majorité d'alcènes, de MeA et de diMeA internes. L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse préparative permettrait facilement de séparer ces deux parties afin de les tester en comportement et de vérifier nos hypothèses. Chez Ps, les tests comportementaux ont montré que seuls les HCs branchés induisent une réponse identique à la fraction hydrocarbonée. Ce résultat suggère que Ps ne discrimine les autres espèces qu'à partir de leurs HCs branchés.

Sur la cuticule, les HCs importants pour la reconnaissance coloniale et ceux indispensables pour la lutte contre la dessiccation coexistent dans un équilibre précaire. En effet, les HCs impliqués dans la lutte contre la dessiccation possèdent une haute température de fusion et sont par conséquent moins volatiles, tandis que ceux impliqués dans la communication chez les insectes sont plus volatiles. L'ensemble du mélange hydrocarboné peut donc influencer la température de fusion générale de la cuticule, suivant les conditions climatiques, l'environnement ou la situation sociale de l'individu. La PPG peut donc être considérée comme une réponse évolutive au problème posé par la présence sur la cuticule des 2 types d'HCs. Les hautes températures sont des facteurs environnementaux dangereux pour la survie des individus à moyen terme tandis que l'agressivité des congénères dans le cas d'un manque d'indices coloniaux est un danger continu, immédiat et qui peut être fatal. La PPG devient ainsi un réservoir de grande capacité, facilement accessible et efficace pour reconstituer son odeur coloniale quelles que soient les situations rencontrées. Mais si la PPG est un organe essentiel pour la cohésion sociale des fourmis, pourquoi n'existe-t-elle pas chez les autres insectes sociaux? Des travaux récents ont montré que chez la guêpe, la glande de Dufour possède la même composition hydrocarbonée que la cuticule (Fig. 11) (Singer, Espelie & Gamboa, 1998). Chez l'abeille, la glande mandibulaire ainsi que les glandes à cire seraient impliquées dans les mécanismes de reconnaissance (Breed, 1998). Enfin, pour les termites, les glandes tégumentaires et labiales sont soupçonnées d'avoir un rôle dans la circulation des HCs ou dans la constitution de l'odeur coloniale (Clément & Bagnères, 1998).

Au sein d'une colonie, les individus qui homogénéisent régulièrement leurs HCs avec ceux de leurs congénères présentent néanmoins une certaine forme de variabilité individuelle sans qu'il y ait de phénomène de rejet. Celle-ci peut être liée à une variabilité des proportions de l'ensemble des HCs ou à la présence d'une substance particulière. Quel est le seuil de variabilité maximale "permis" dans la proportion relative des HCs cuticulaires pour que l'individu ne soit pas rejeté? L'utilisation du test d'immobilisation permettrait de déterminer

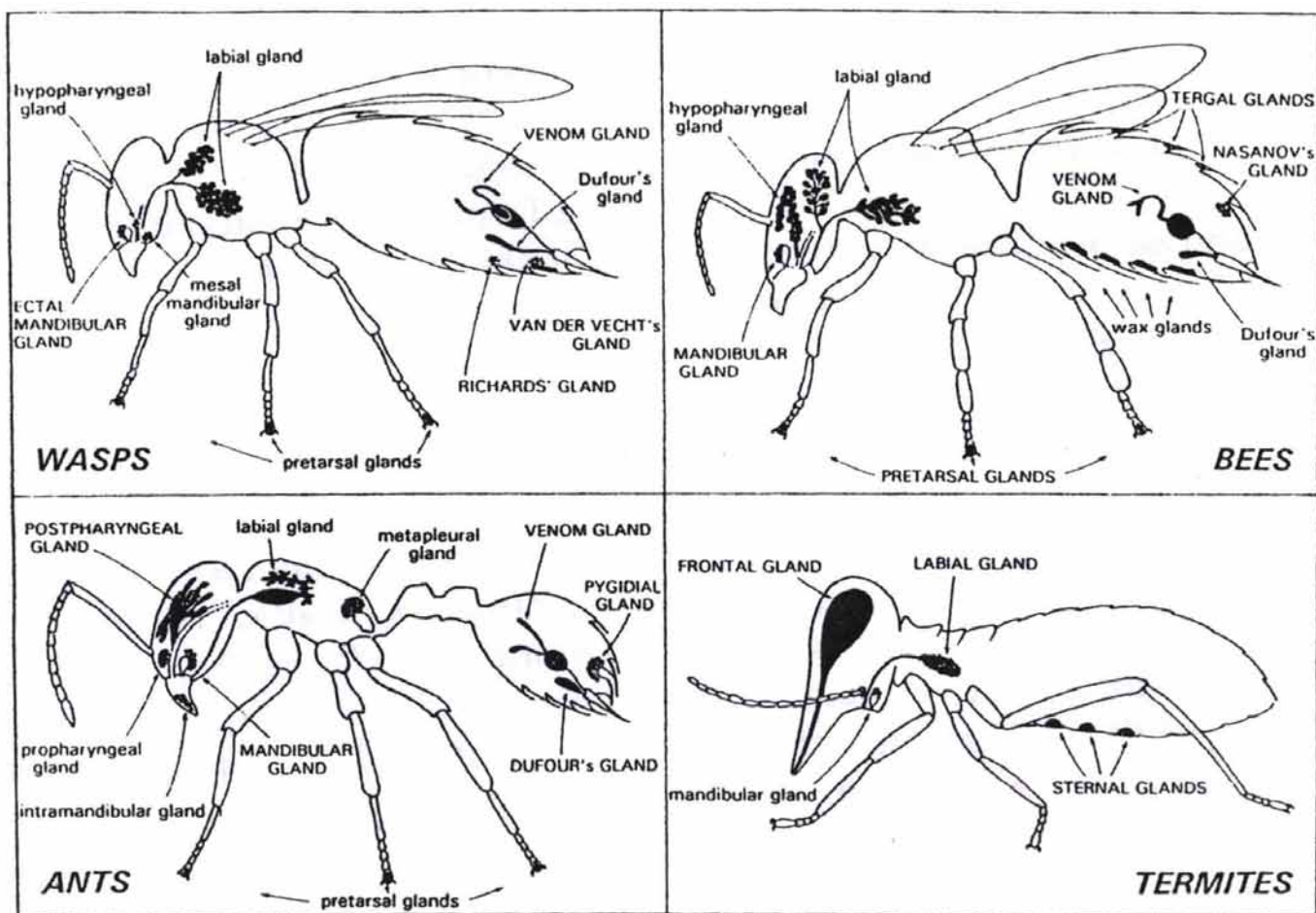


Figure 11: Schéma montrant la majorité des glandes exocrines de la guêpe, l'abeille, la fourmi et la termite. Les glandes ayant une fonction phéromonales sont inscrites en lettres capitales (Billen & Morgan, 1998).

quel est ce seuil de tolérance et permettrait ainsi de mieux cerner les proportions des HCs impliqués dans la reconnaissance coloniale. La présence d'une substance particulière chez un ou plusieurs individus uniquement, comme c'est le cas des phéromones de fertilité, est plus compliquée à comprendre si l'on considère l'existence d'une homogénéisation des odeurs entre les membres de la colonie. Néanmoins, il a été observé que de par leur statut spécial de pondeuses ces individus sont physiquement évités et semblent n'avoir que peu d'interactions sociales autres qu'alimentaires. De plus, la substance étant produite seulement par les individus fertiles, même si une petite quantité pourrait être échangée avec un congénère, celle-ci serait vite diluée dans le reste des HCs pour finir par disparaître avec le renouvellement continu du profil hydrocarboné. Chez *P. inversa*, la phéromone de fertilité a été identifiée comme étant le 3,11-diMeC27 représentant environ 50% du profil hydrocarboné de la reine et 5% de celui des ouvrières (Heinze *et al.*, 2002). Ainsi, loin d'être absent du profil hydrocarboné des ouvrières stériles, cette phéromone produite en grande quantité par la reine se retrouve chez tous les individus en quantité faible dans notre étude (Tab. 1b.1A, p. 38: 0,85% dans la cuticule et 2,28% dans la PPG). De la même manière, Meskali *et al.* (1995) démontre que l'application topicale sur la cuticule d'un seul individu de (Z)-9-tricosène, non synthétisé par l'espèce (*Camponotus vagus*), se retrouve chez tous les membres de la colonie en quantité faible. La quantité de cette molécule décroît très rapidement en quelques heures, alors que la quantité de *n*-C24 (molécule produite par les ouvrières) dans les mêmes conditions décroît beaucoup plus lentement. Ceci confirme non seulement l'existence d'une circulation de tous les HCs entre tous les individus mais aussi qu'une molécule synthétisée par un seul individu est très rapidement diluée voire éliminée du profil hydrocarboné des autres membres de la colonie. Seule la quantité de la molécule en question est différente entre la reine et les ouvrières, or c'est très certainement cette différence de quantité qui est déterminante dans le rôle de cette phéromone. Malheureusement, Heinze *et al.* (2002) ne donne aucune information ou identification concernant les isomères de cette phéromone qui doivent pourtant être présents de façon non négligeable dans le même pic d'élution que le 3,11-diMeC27 tel que le 3,7- et le 3,9- comme le montrent nos résultats (Tab. 1b.1A, p. 38). Le test d'immobilisation permettrait là encore de déterminer s'il existe véritablement une réponse comportementale particulière des individus stériles face aux phéromones de fertilité. Enfin, le système d'immobilisation pourrait servir comme outil pour étudier notamment les phénomènes d'apprentissage, d'habituation et de mémoire chez les fourmis.

L'étude approfondie des HCs de la cuticule et de la PPG est très certainement la clé pour comprendre les mécanismes de maintien de la cohésion sociale au sein du groupe. Mais,

une autre approche scientifique du problème pourrait apporter de nombreuses réponses complémentaires concernant la reconnaissance des apparentés, c'est l'étude des récepteurs chimiques des HCs très certainement contenus dans les antennes. Car s'il est important de comprendre les bases chimiques et comportementales de la formation du "visa" colonial, il est tout aussi important de comprendre de quelle façon le signal porté par les individus sur la cuticule est perçu par ses congénères. La première question qui se pose, c'est le mécanisme d'action de molécules aussi peu réactives que des HCs sur des récepteurs de nature protéique. La détection et l'isolement de ces récepteurs par des HCs marqués ouvriraient la voie à une étude approfondie par le biais de la biochimie, de l'électrophysiologie et du comportement qui apporterait des conclusions sur: la spécificité des récepteurs chimiques, les mécanismes d'interactions chimiques avec les HCs, la nature et le nombre des HCs nécessaires pour déclencher une réponse comportementale de reconnaissance des apparentés, etc... La seconde question plus complexe à résoudre concerne la perception des différentes odeurs coloniales. Un récepteur est-il capable d'évaluer une différence de proportion d'un HC provenant de deux odeurs différentes? Ou bien est-ce le nombre et la nature des récepteurs qui déterminent la capacité de perception d'un individu? Deux individus appartenant à deux colonies différentes présentant les mêmes HCs cuticulaires seraient-ils capables de se discriminer l'un l'autre au moyen d'une simple différence de récepteurs chimiques sur leurs antennes?

RÉFÉRENCES

(compléments)

RÉFÉRENCES

(compléments)

- Aron S, Passera L. 2000.** *Les sociétés animales: évolution de la coopération et organisation sociale*. De Boeck Université, Bruxelles.
- Bernard F. 1972.** Premiers résultats de dénombrement de la faune par carres en Afrique. *Bull. Soc. Hist. Afr. Nord* **63**: 3-13.
- Billen J, Morgan ED. 1998.** Pheromone communication in social insects: sources and secretions. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML, eds. *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, Colorado: Westview Press. 3-33.
- Blomquist GJ, Dillwith JW, Adams TS. 1984.** Sex pheromone of the housefly: metabolism of (Z)-9-tricosene to (Z)-9,10-epoxytricosane and (Z)-14-tricosene-14-one. *Insect. Biochem.* **14**: 279-284.
- Blomquist GJ, Nelson DR, De Renobales M. 1987.** Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **6**: 227-265.
- Bolton B. 1994.** *Identification guide to the ant genera of the world*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Breed MD. 1998.** Chemical cues in kin recognition: criteria for identification, experimental approaches, and the honey bee as an example. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML, Espelie KE, eds. *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, Colorado: Westview Press. 126-155.
- Brossut R. 1996.** *Phéromones: la communication chimique chez les animaux*. CNRS Editions, Paris.
- Cammaerts MC, Cammaerts R. 1998.** Marking of nest entrance vicinity in the ant *Pheidole pallidula* (Formicidae, Myrmicinae). *Behav. Process.* **40**: 25-34.
- Cammaerts MC, Cammaerts R. 1999.** Marking of nest entrances and their vicinity in the ant *Myrmica rubra*. *Biologica* **54**: 553-566.
- Cammaerts MC, Morgan ED, Tyler R. 1977.** Territorial marking in the ant *Myrmica rubra* L. (Formicidae). *Biol. Behav.* **2**: 263-272.

- Chan Yong TP, Jallon JM. 1986.** Synthèse de novo d'hydrocarbures potentiellement aphrodisiaques chez les Drosophiles. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D Sci. Nat.* **303**: 197-202.
- Chase J, Touhara K, Prestwich GD, Schal C, Blomquist GJ. 1992.** Biosynthesis and endocrine control of the production of the German cockroach sex pheromone 3,11-dimethylnonacosan-2-one. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 6050-6054.
- Clément JL, Bagnères AG. 1998.** Nestmate recognition in termites. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML, eds. *Pheromone communication in social insects*. Boulder, Colorado: Westview Press. 126-155.
- Coyne JA, Oyama R. 1995.** Localisation of pheromonal sexual dimorphism in *Drosophila melanogaster* and its effect on sexual isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9505-9509.
- Crozier RH, Dix MW. 1979.** Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social hymenoptera. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **4**: 217-224.
- Crozier RH, Pamilo P. 1996.** *Evolution of social insect colonies: sex allocation and kin selection*. Oxford University Press, New York.
- Cuvillier-Hot V, Gadagkar R, Peeters C, Cobb M. 2002.** Regulation of reproduction in a queenless ant: aggression, pheromones and reduction in conflict. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* **269**: 1295-1300.
- Dallerac R, Labeur C, Jallon JM, Knipple DC, Roelofs WL, Wicker-Thomas C. 2000.** A delta-9 desaturase gene with a different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in *D. melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 9449-9454.
- Darwin C. 1859.** *On the origin of species.* (Facsimile of 1st edition, 1964). Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- De Renobales M, Blomquist GJ. 1984.** Biosynthesis of medium chain fatty acids in *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.* **228**: 407-414.
- De Renobales M, Woodin TS, Blomquist GJ. 1986.** *Drosophila melanogaster* fatty acid synthetase. Characteristics and effect of protease inhibitors. *Insect. Biochem.* **16**: 887-894.
- Dettner K, Liepert C. 1994.** Chemical Mimicry and Camouflage. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 129-154.
- Durand JL. 1998.** Taux de dispersion des valeurs propres en ACP, AC et ACM. *Mathématiques, Informatique et Sciences Humaines* **144**: 15-28.

- Eigenbrode SD, Espelie KE. 1995.** Effects of Plant Epicuticular Lipids on Insect Herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* **40**: 171-194.
- Ferveur J-F, Jallon J-M. 1996.** Genetic control of male cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* **67**: 211-218.
- Fresneau D. 1994.** Biologie et comportement social d'une fourmi ponerine neotropicale (*Pachycondyla apicalis*): Ph.D. Thesis, Université Paris XIII. 331.
- Gibbs AG. 1998.** Water-proofing properties of cuticular lipids. *Am. Zool.* **38**: 471-482.
- Hamilton WD. 1964.** The genetical evolution of social behaviour. I, II. *J. Theor. Biol.* **7**: 1-52.
- Heinze J, Stengl B, Sledge MF. 2002.** Worker rank, reproductive status and cuticular hydrocarbon signature in the ant, *Pachycondyla cf. inversa*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **52**: 59-65.
- Higashi S, Yamauchi K. 1979.** Influence of a supercolonial ant *Formica yessensis* Forel on the distribution of other ants in Ishikari coast. *Jpn. J. Ecol.* **29**: 257-264.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1977.** The number of queens: an important trait in ant evolution. *Naturwissenschaften* **64**: 8-15.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990.** *The ants*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Howard RW. 1993.** Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: Stanley-Hammel DW, Nelson DR, eds. *Insect lipids : Chemistry, biodiversity and biology*. Nebraska: University of Nebraska Press. 179-226.
- Imai HT, Taylor RW, Crossland MWJ, Crozier RH. 1988.** Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63**: 159-185.
- Jaffe K, Lopez ME, Aragort W. 1986.** On the communication systems of the ants *Pseudomyrmex termitarius* and *P. triplarinus*. *Insect. Soc.* **33**: 105-117.
- Jaisson P. 1993.** *La fourmi et le sociobiologiste*. Editions Odile Jacob, Paris.
- Jallon JM, Hotta Y. 1979.** Genetic and behavioral studies of female sex appeal in *Drosophila*. *Behav. Genet.* **9**: 257-275.
- Karlson P, Lüscher M. 1959.** "Pheromones", a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**: 55-56.
- Kempf WW. 1964.** On the number of ant species in the Neotropical region. *Stud. Entomol.* **7**: 481-482.
- Lenoir A, Fresneau D, Errard C, Hefetz A. 1999.** Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. In: Detrain C, Deneubourg

- JLPasteels JM, eds. *Information processing in social insects*. Berlin: Birkhauser verlag. 219-237.
- Lucas C, Fresneau D, Kolmer K, Heinze J, Delabie JHC, Pho DB. 2002.** A multidisciplinary approach to discriminating different taxa in the species complex *Pachycondyla villosa* (Formicidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **75**: 249-259.
- Lucas C, Pho DB, Fresneau D, Jallon JM. submitted.** Purification of lipophorin from the ant *Pachycondyla villosa* and comparison between postpharyngeal gland, cuticle and lipophorin hydrocarbons. *Insect Biochem. Molec. Biol.*
- Mayade S, Cammaerts MC, Suzzoni JP. 1993.** Home-range marking and territorial marking in *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera, Formicidae). *Behav. Process.* **30**: 131-142.
- Meskali M, Bonavita-Cougourdan A, Provost E, Bagneres AG, Dusticier G, Clement JL. 1995.** Mechanism underlying cuticular hydrocarbon homogeneity in the ant *Camponotus vagus* (Scop.)(Hymenoptera: Formicidae): Role of postpharyngeal glands. *J. Chem. Ecol.* **21**: 1127-1148.
- Michener CD. 1969.** Comparative social behavior of bees. *Annu. Rev. Entomol.* **14**: 299-342.
- Michener CD. 1974.** *The social behavior of the bees: a comparative study*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Michener CD, Brothers DJ. 1974.** Were workers of eusocial Hymenoptera initially altruistic or oppressed? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 671-674.
- Monnin T, Malosse C, Peeters C. 1998.** Solid-phase microextraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *J. Chem. Ecol.* **24**: 473-490.
- Noble-Nesbitt J. 1991.** Cuticle permeability and its control. In: Binnington K, Retnakaran A, eds. *Physiology of the insect epidermis*. East Melbourne: CSIRO Pubs. 252-283.
- Pennanec'h M, Bricard L, Kunesh G, Jallon JM. 1997.** Incorporation of fatty acids into cuticular hydrocarbons of male and female *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **43**: 1111-1116.
- Pennanec'h M, Pho DB, Pechine JM, Jallon JM. 1995.** Insect hydrocarbons: analysis, structures and functions. *EPPO Bulletin* **25**: 343-348.
- Pho DB, Pennanec'h M, Jallon JM. 1996.** Purification of adult *Drosophila melanogaster* lipophorin and its role in hydrocarbon transport. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **31**: 289-303.
- Roelofs WL, Wolf WA. 1988.** Pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *J. Chem. Ecol.* **14**: 2019-2031.

- Rouault J, Capy P, Jallon JM. 2000.** Variations of male cuticular hydrocarbons with geoclimatic variables: an adaptative mechanism in *Drosophila melanogaster* ? *Genetica* **110**: 117-130.
- Schal C, Sevala VL, Young HP, Bachmann JAS. 1998.** Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: Cuticle and ovary as target tissues. *Am. Zool.* **38**: 382-393.
- Scherrer B. 1984.** *Biostatistique*, Quebec.
- Singer TL. 1998.** Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Am. Zool.* **38**: 394-405.
- Singer TL, Espelie KE, Gamboa GJ. 1998.** Nest and nestmate discrimination in independent-founding paper wasps. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML, eds. *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, Colorado: Westview Press. 104-125.
- Soroker V, Lucas C, Simon T, Fresneau D, Durand JL, Hefetz A. submitted.** The significance of within-group hydrocarbons distribution for workers of *Pachycondyla apicalis*. *Insect. Soc.*
- Vander Meer RK, Morel L. 1998.** Nestmate recognition in ants. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML, eds. *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, Colorado: Westview Press. 79-103.
- Wicker-Thomas C, Henriot C, Dallerac R. 1997.** Partial characterization of a fatty acid desaturase gene in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **27**: 963-972.
- Wicker-Thomas C, Jallon JM. 2001.** Control of female pheromones in *Drosophila melanogaster* by homeotic genes. *Genet. Res.* **78**: 235-342.
- Wilson EO. 1971.** *The insect societies*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Wilson EO. 1988.** The biogeography of the West Indian ants (Hymenoptera: Formicidae). In: Liebherr JK, ed. *Zoogeography of Caribbean insects*. Ithaca, New York: Cornell University Press. 214-230.
- Young HP, Bachmann JAS, Sevala V, Schal C. 1999.** Site of synthesis, tissue distribution, and lipophorin transport of hydrocarbons in *Blattella germanica* (L.) nymphs. *J. Insect Physiol.* **45**: 305-315.

Young HP, Larabee JK, Gibbs AG, Schal C. 2000. Relationship between tissue-specific hydrocarbon profiles and lipid melting temperatures in the cockroach *Blattella germanica*. *J. Chem. Ecol.* **26**: 1245-1263.

« Mon enfance, ma libre et solitaire adolescence, toutes deux préservées du souci de m'exprimer, furent toutes deux occupées uniquement de diriger leurs subtiles antennes vers ce qui se contemple, s'écoute, se palpe et se respire. »

COLETTE

Étude des bases chimiques et comportementales de la formation du "visa" colonial chez les Ponérines du genre *Pachycondyla*

La reconnaissance de parentèle est l'un des thèmes majeurs de la recherche concernant les Insectes Sociaux. Plusieurs travaux ont suggéré que les hydrocarbures (HCs) constituaient un élément important dans cette reconnaissance. Toutefois, il n'est pas aisé de comprendre les mécanismes de circulation des HCs impliqués dans la formation du "visa" colonial. Comment la colonie peut-elle générer un signal collectif à partir de caractéristiques individuelles? Nous avons voulu aborder ce problème grâce à deux approches différentes mais complémentaires: une caractérisation chimique des HCs et une étude comportementale comparative. Pour ce faire nous avons étudié plusieurs espèces primitives du genre *Pachycondyla* qui ne font pas de trophallaxie et qui possèdent des taux de toilettage social faibles.

Les résultats de nos analyses chimiques ont permis de clarifier un problème de systématique au sein du genre *Pachycondyla*. Pour appuyer ces données chimiques, nous avons entrepris une série d'analyses recouvrant de nombreux domaines tels que la biométrie, la morphologie, la microscopie, l'enzymologie, la génétique et le comportement qui démontrent l'existence non pas d'une seule espèce, *P. villosa*, mais au contraire d'un complexe d'espèces. Ainsi, une espèce jusqu'ici classée en synonymie taxonomique avec *P. villosa*, nommée *P. inversa* s'avère être une espèce "vraie" et une autre espèce jusqu'alors inconnue, provisoirement nommée *P. subversa*, a pu être caractérisée. Ces trois espèces proches qui présentent de grandes similitudes morphologiques possèdent pourtant de nettes différences dans leur profil hydrocarboné cuticulaire. Ceci constitue un modèle scientifique propice à une étude comparée dans le cadre du problème de la reconnaissance de parentèle.

Dans la majorité des travaux, l'analyse de la reconnaissance de parentèle reste limitée à une description chimique des HCs cuticulaires présumés constituer la signature coloniale. Afin de tester le rôle des principales familles chimiques d'hydrocarbures cuticulaires impliqués dans la reconnaissance des apparentés, nous avons mis au point un test éthologique permettant de mesurer l'agressivité des individus dans différentes conditions, face à un autre individu ou face à un extrait chimique. Ce nouveau test facile d'emploi n'entraîne pas de blessure lors des rencontres et démontre l'existence non seulement d'une hiérarchisation de l'agressivité directement liée à l'éloignement génétique des individus testés mais aussi l'existence d'une réponse comportementale spécifique. De plus chez *P. subversa*, la réponse comportementale provoquée par un individu d'une espèce est de même intensité que celle induite par les extraits hydrocarbonés de cette même espèce. Parmi l'ensemble des extraits lipidiques cuticulaires testées, seuls les hydrocarbures branchés induisent une réponse comportementale significativement différente du témoin et de même intensité que la fraction hydrocarbonée totale. Ceci suggère que *P. subversa* ne discrimine les autres espèces que par les HCs branchés de ces dernières qui sont différents des siens.

L'élaboration d'un signal collectif en tant que signature coloniale suppose une circulation des HCs à l'intérieur de chaque individu et entre tous les individus appartenant à la même colonie. Nos travaux permettent de mieux cerner ce schéma de circulation et d'homogénéisation des HCs impliqués. Les HCs nouvellement biosynthétisés sont transportés par la lipophorine jusqu'à la cuticule et non à la PPG qui par ailleurs ne synthétise pas d'hydrocarbures. Chez les espèces supérieures de fourmis, les échanges entre individus se font pour une part importante par trophallaxie. Dans les 4 espèces de *Pachycondyla* étudiées les HCs doivent être échangés par contacts corporels comme chez *P. apicalis*. Lors des toilettages individuels la PPG récupère les HCs individuels accumulés essentiellement sur les brosses basitarsales (selfgrooming) et les HCs de ses congénères (allogrooming et contacts corporels). L'ensemble du mélange homogénéisé des HCs de la PPG est ensuite redistribué sur toute la cuticule de chaque individu constituant ainsi une "odeur" coloniale.

L'analyse comparative des profils hydrocarbonés, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, montre que la cuticule, la PPG et la lipophorine ne présentent aucune différence qualitative. Par contre, de nettes différences quantitatives sont observées entre la cuticule et la lipophorine d'une part et la PPG d'autre part. Ainsi, les *n*-alcane et les monométhylalcanes externes sont en très faible concentration, voire absents de la PPG. Les HCs de la PPG et de la cuticule induisant une réponse comportementale identique, les *n*-alcane et les monométhylalcanes externes ne seraient pas porteurs d'informations coloniales. Ceci est prouvé par nos tests comportementaux, au moins en ce qui concerne les *n*-alcane. Par contre, leurs propriétés physico-chimiques en font de bons candidats pour protéger les insectes contre la dessiccation, à l'inverse des autres familles d'HCs. En revanche, les HCs présents en proportion similaire sur la cuticule et dans la PPG (compte non tenu des *n*-alcane et des monométhylalcanes externes) diffèrent dans leurs proportions d'une colonie à l'autre et sont par conséquent les plus susceptibles de participer de façon prépondérante à la reconnaissance coloniale.