

**ÉCOLE DOCTORALE : SANTÉ, SCIENCES, TECHNOLOGIES**

**Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS 6035**

# **THÈSE** présentée par :

**Danival de SOUZA**

soutenue le : **19 mai 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

## **Comportement social et réponses immunitaires chez la fourmi *Camponotus fellah* : Implications de la bactérie endosymbiote *Blochmannia***

**THÈSE dirigée par :**  
**M. Alain Lenoir**

Professeur, Université François - Rabelais

**RAPPORTEURS :**  
**M. Didier Bouchon**  
**Mme Claudie Doums**

Professeur, Université de Poitiers  
Maître de Conférences, HDR, Université Paris VI

**JURY :**  
**M. Didier Bouchon**  
**Mme Claudie Doums**  
**M. Jean-Michel Drezen**  
**M. Dominique Fresneau**  
**M. Claudio Lazzari**  
**M. Alain Lenoir**

Professeur, Université de Poitiers  
Maître de Conférences, HDR, Université Paris VI  
Chargé de Recherches, HDR, Université François - Rabelais  
Professeur, Université Paris XIII  
Professeur, Université François - Rabelais  
Professeur, Université François - Rabelais

À la memoire de ma sœur Ivanice Souza, dont la passion pour la nature m'a beaucoup  
influencé à devenir biologiste

# Remerciements

Ce travail n'aurait pu être effectué sans l'accord, le soutien et l'aide de plusieurs personnes.

Je tiens tout d'abord à adresser ma gratitude à mon directeur de thèse, le Prof. Alain Lenoir, pour son amitié et pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordée. Aussi, pour m'avoir toujours motivé à réaliser les stages de formation et participer aux réunions scientifiques. Ces moments ont beaucoup contribué à ma formation académique.

J'adresse évidemment mes sincères remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci beaucoup à Claudio Lazzari pour les discussions enrichissantes de biologie en général.

Un grand remerciement à toute l'équipe « Sociobiologie des Fourmis » qui m'a chaleureusement accueillie à Tours. Je n'oublierai pas les discussions avec Christine Errard sur les films merveilleux qu'on avait vu (ou qu'on devrait voir !) le weekend et bien sûr, les discussions sur les fourmis. Egalement, je voudrais exprimer ma gratitude à Jean-Luc Mercier pour la gentillesse qu'il a manifesté à mon égard durant cette thèse. Je remercie beaucoup Raymond Jégat qui a mis une partie de toute son ingéniosité pour construire les nids de fourmis. Je voudrais remercier l'amie Hannah Reynolds pour sa compagnie dans la première année de thèse à Tours. On a pu ensemble surmonter la difficulté d'adaptation au nouveau pays. On a été toujours prêts, tous les deux, à passer de bons moments au Studio de Tours. Je la remercie aussi pour la correction de quelques manuscrits en anglais. Séverine Devers, plus qu'une collègue d'équipe, a été une excellente amie. Elle m'a beaucoup appris les particularités de la langue et de la culture française.

Je remercie les stagiaires qui ont travaillé quelques mois avec moi, Antoine Vanderlick et Johan van Vlaenderen.

Je ne pourrais pas oublier quelques personnes au Brésil qui ont beaucoup contribué à la réalisation de mon rêve de conduire mon doctorat en France. Les professeurs Terezinha Della Lucia, Jacques Delabie, José Henrique Schoereder et Lucio Campos, pour leur soutien à ma demande de bourse d'études. Egalement, je remercie Mme Gerda Kilger qui m'a appris les premières leçons de Français, à l'Alliance Française de Viçosa.

J'ai été financé pendant ces années par la CAPES (organisme du Ministère de l'Éducation du Brésil). Je suis très reconnaissant aux travaux de plusieurs personnes (anonymes) qui permettent d'envoyer chaque année des centaines d'étudiants à l'étranger.

Avec compétence, ils nous apportent de loin tout leur soutien à la réalisation de nos travaux de thèse.

Jamais je n'aurai pu réaliser cette recherche doctorale sans les portes ouvertes de l'Équipe Génome et Stratégies Parasitaires. Je remercie Jean-Michel Drezen pour la liberté d'utiliser le laboratoire de son équipe. Je tiens à remercier spécialement Elisabeth Huguet pour sa très grande disponibilité et son calme à m'expliquer « où sont les choses » et « comment le faire ». De même, je remercie Céline Serbielle, Jérôme Lésobre et Aurore Dubuffet. Sans l'aide d'Annie Bezier, je n'aurai jamais conclu la quantification des bactéries endosymbiotes de *Camponotus*. Je la remercie beaucoup pour tout son temps dépensé avec moi. Delphine Depoix a accompagné mes débuts en biologie moléculaire, merci pour tout.

Je remercie Yannick Moret de m'avoir accueilli pour une semaine à Dijon. J'ai beaucoup appris avec lui sur le système immunitaire des invertébrés.

Je remercie Heike Feldhaar et son équipe de l'Université de Würzburg, Allemagne et l'aide des doctorants Sascha Stoll et Christian Tritsch pour avoir fait partager leur technique de FISH pour la détection de *Blochmannia*.

Au début de ma thèse, j'ai été accueilli au DESCO. J'ai eu l'opportunité de connaître mes amis Yadira et Alexandre. Je les remercie pour la compagnie et l'aide aux moments où j'en ai eu besoin.

Je remercie les secrétaires du DESCO et de l'IRBI pour leur soutien administratif. Mme Dominique Le Glaunec, Mme Christine Besse et Mme Sonia Djaoui, je leur suis très reconnaissant.

Un grand remerciement à tout l'IRBI, sa direction et son personnel. Merci à Franck Dedeine pour les discussions « endosymbiotiques » et à Jean-Philippe Christides pour l'analyse des données comportementales et discussions sur la culture en général. Je n'oublierai évidemment pas Sébastien Molina, Romina Barrozo, David Giron, Fabienne Dupuy, Aurélie Bodin, Jérémy Defrize, Teresita Lazzari, Wilfried Kaiser, Nadine Fresquet, pour l'attention et les bons moments passés ensemble.

Plusieurs personnes ont permis que les colonies de *Camponotus* sortent d'Israël, en des moments distincts, et arrivent à l'IRBI : le Dr. Abraham Hefetz de l'Université de Tel-Aviv, Raphaël Boulay et les étudiants de l'Université de Lausanne, Danielle Mersch et Sthéphane Dorsaz. Sans ces nombreuses colonies, il n'était pas possible de réaliser la thèse. Merci à Guy Bourdais pour m'aider à entretenir les colonies de *Camponotus*.

A l'extérieur de l'Université, j'ai connu beaucoup de gens exceptionnels. Quelques-uns étaient essentiels pour le maintien de ma santé et mon moral, sans quoi je ne pouvais pas

arriver au but de cette démarche. C'était aussi l'occasion de connaître une France encore plus intéressante que celle restreinte au monde universitaire.

Je félicite mon Acer TravelMate 2000, qui m'a beaucoup aidé à préparer cette thèse. J'espère qu'il prendra, bientôt, des vacances méritées avec moi au Brésil.

## Résumé

La vie en société présente des avantages écologiques et évolutifs, mais augmente les risques de transmission de pathogènes. Pour faire face à ce problème, les insectes sociaux ont développé plusieurs mécanismes de défenses comportementales et physiologiques, et en plus utilisé la protection fournie par des organismes tiers. C'est ainsi que des abeilles et des fourmis se servent de substances antimicrobiennes d'origine végétale ou des fourmis possèdent des bactéries productrices d'antibiotiques. La fourmi est un insecte qui, par définition, ne peut vivre que dans sa société avec des congénères avec lesquels elle entretient des relations nombreuses comme des léchages interindividuels et des échanges en bouche à bouche (appelés trophallaxies). Dans la première partie de la thèse, nous avons étudié les altérations comportementales des ouvrières de la fourmi *Camponotus fellah* après le déclenchement d'une réaction immunitaire. Nous avons posé l'hypothèse que si les relations sociales sont aussi coûteuses que les défenses immunitaires physiologiques, l'individu devrait être confronté à un choix : où investir son énergie ? Au contraire, suite à une réaction immunitaire les fourmis ont augmenté leur taux de trophallaxie et aucun signe d'isolement de l'ouvrière malade ne fut observé. Ce résultat met en évidence l'importance des relations sociales pour la guérison de l'individu et qui peuvent même avoir une fonction prophylactique. La deuxième partie a été consacrée à l'étude d'un endosymbiote primaire de *C. fellah*, une bactérie du genre *Blochmannia*. Cet endosymbiote a un rôle nutritif qui a été déjà montré chez d'autres espèces de *Camponotus*. Nous avons envisagé qu'il ait aussi d'autres fonctions comme : favoriser le système immunitaire de la fourmi, favoriser le développement des nouvelles colonies et participer à la formation de l'odeur coloniale. Nous avons d'abord décrit cette nouvelle bactérie par des techniques de biologie moléculaire. Ensuite, nous avons pu montrer qu'elle favorise la réponse immunitaire des fourmis en augmentant l'encapsulation de particules étrangères. Elle contribue à une plus grande production de larves, aboutissant à une plus grande quantité d'ouvrières. Nous n'avons pas mis en évidence de lien entre la quantité de bactéries et celle d'hydrocarbures cuticulaires, bien que leur élimination par un antibiotique entraînait une surproduction de ces hydrocarbures, probablement une réponse liée au stress. Plus généralement, ces travaux montrent de nouvelles fonctions des endosymbiotes, qui ont probablement contribué au succès écologique de ce groupe de fourmis hautement diversifié et très répandu.

**Mots-clés :** Fourmis, *Camponotus*, *Blochmannia*, Interactions sociales, Réponses immunitaires, Bactéries endosymbiotiques, Encapsulation, Peptides antimicrobiens.

## Résumé en anglais

The colonial lifestyle has ecological and evolutionary advantages, but it increases the risks of pathogen transmission. To minimize this problem, social insects have developed several behavioural and physiological defence mechanisms, including using protection provided by other organisms. Bees and ants utilize antimicrobial substances of vegetable origin and ants harbour antibiotics-producing bacteria to control parasites. Ants are insects that cannot live without their nestmates with which they maintain many interactions, such as grooming and trophallaxis. In the first part of this thesis, we studied the behavioural alterations in workers of the ant *Camponotus fellah* after mounting an immune response. We hypothesized that if social interactions and physiological immune responses are expensive, individual workers should be forced to choose where to invest energy. In fact, after mounting an immune response, the workers increased their trophallaxis rate and no sign of avoidance by nestmates was observed. This result highlights the importance of social relations for individual cure and prophylactic mechanisms. In the second part, we studied the primary endosymbiont of *C. fellah*, a bacterium of *Blochmannia* genus. This bacterium plays a role in ant nutrition, a function already demonstrated in other *Camponotus* species. We considered the possibility that the importance of this association is not exclusively nutritional. The bacterium might improve the host immune system and increase the development rate of incipient colonies. Indeed, it might be involved in colony odour formation. The first step was to describe formally this new bacterium with molecular biology techniques. Next, we showed that it improves the host immune response by increasing the encapsulation rate against foreign particles. It increases host larvae production and the number of adult workers. Though we did not find a relation between the number of bacteria and the amount of cuticular hydrocarbons, when the bacteria was eliminated with antibiotics, cuticular hydrocarbons were overproduced, which could be interpreted as a stress response. This work highlights new functions of *Blochmannia* endosymbionts in their association with the ants. The bacterium likely contributed to the ecological success of *Camponotus* ants, a globally widespread genus.

**Key-words:** Ants, *Camponotus*, *Blochmannia*, Social interactions, Immune response, Endosymbiotic bacteria, Encapsulation, Antimicrobial peptides.

# Table des matières

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Remerciements</b> .....                                                                                                                    | 2   |
| <b>Résumé</b> .....                                                                                                                           | 5   |
| <b>Résumé en anglais</b> .....                                                                                                                | 6   |
| <b>Table des matières</b> .....                                                                                                               | 7   |
| <b>Introduction</b> .....                                                                                                                     | 8   |
| <b>Lignes générales de la thèse</b> .....                                                                                                     | 25  |
| <b>Première partie</b> Relations sociales chez les fourmis : corrélats immunologiques .....                                                   | 26  |
| Article 1 - Immune response affects ant trophallactic behaviour (Journal of Insect Physiology, sous presse) .....                             | 33  |
| <b>Deuxième partie</b> L'endosymbiote primaire <i>Blochmannia</i> : quelles conséquences pour la fourmi <i>Camponotus fellah</i> ? .....      | 52  |
| Article 2 ' <i>Candidatus</i> <i>Blochmannia fellah</i> ' sp. nov., an endosymbiont of the ant <i>Camponotus fellah</i> .....                 | 66  |
| Article 3 Endosymbionts <i>Blochmannia</i> improve colony growth and immune defence in the ant <i>Camponotus fellah</i> (en préparation)..... | 78  |
| Article 4 A trade-off between endosymbiont bacteria and cuticular hydrocarbons in the ant <i>Camponotus fellah</i> (en préparation) .....     | 97  |
| <b>Conclusion finale</b> .....                                                                                                                | 112 |
| <b>Bibliographie</b> .....                                                                                                                    | 114 |



# Introduction

La vie en groupe présente de nombreux avantages, comme par exemple la répartition des tâches, mais aussi des risques, par exemple d'accroître la transmission de parasites et pathogènes variés. Cette assertion est valable pour toutes les créatures, y compris l'être humain. La proximité entre individus, souvent génétiquement apparentés ou même très apparentés, favorise le taux de transmission de certains pathogènes, ce qui, en dernière instance, pourrait causer la disparition de la société entière. Ce fait peut sembler paradoxal puisque « vivre en groupe » est généralement invoqué dans la littérature comme la principale cause du succès écologique de plusieurs espèces, notamment des insectes sociaux (Encadré 1). Des insectes vivant et s'organisant en colonies comme les abeilles, les guêpes, les fourmis ou les termites sont capables de pratiquer des tâches complexes dans leur quotidien via la coopération et l'altruisme, tels le fourragement (incluant la recherche, la localisation et le transport de la nourriture), la construction et la protection du nid (Hölldobler et Wilson, 1990; Passera et Aron, 2005; Wilson, 1971). Une colonie d'insectes sociaux est relativement stable dans l'espace et dans le temps. Donc, cette colonie devient une ressource très attirante pour d'autres êtres vivants commensales mais aussi parasites : virus, bactéries, champignons (Fig. 1), protozoaires, helminthes ainsi que des parasitoïdes et même d'autres espèces sociales (Schmid-Hempel, 1998).



Figure 1 – Une ouvrière de *Camponotus fellah* tuée par *Metarhizium anisopliae*.

Parmi les insectes sociaux, les fourmis se distinguent comme l'un des plus importants groupes d'animaux. Elles sont apparues il y a 120 millions d'années, vers la mi-Crétacé (Agosti et al., 1998) et même pour certains auteurs au Jurassique, -199 à -145,5 Ma. (Crozier et al., 1997) et comptent aujourd'hui plus de 12.000 espèces décrites (actualisation régulière du nombre d'espèces sur Antbase <http://www.antbase.org/> ) – sur un total estimé à 20.000 – qui ont colonisé comme les humains la plupart des biomes terrestres. Leur nombre d'individus étant aussi très important, il est estimé que la biomasse de la myrmécofaune excède le poids de toute l'humanité (Passera et Aron, 2005).

L'histoire de vie des insectes sociaux prédit l'apparition d'innombrables parasites et les théories d'épidémiologie que les risques d'épidémie sont importants chez eux (Schmid-Hempel, 1995). En réponse à ces risques inhérents à leur mode de vie social, elles ont développé un arsenal efficace pour éviter les risques d'infection. Ces stratégies de défenses comprennent des mécanismes physiologiques et comportementaux, agissant sur le plan individuel et/ou collectif. La réponse immunitaire pourrait être liée aussi aux tâches effectuées par chaque individu. C'est ainsi qu'on observe une augmentation de l'activité de l'enzyme phénoloxydase chez les fourrageuses de la fourmi *Cataglyphis velox*, une catégorie qui pourrait être plus exposée aux pathogènes (Bocher et al., 2007).

### Encadré 1 : Brève définition de l'eusocialité.

L'eusocialité est considérée le degré ultime de la socialité. Le terme a été utilisé pour la première fois en 1966 (Batra, 1966) et repris plus tard par Wilson (Wilson, 1971), qui lui a donné un sens plus définitif. Selon ses critères, l'eusocialité est atteinte quand trois critères biologiques sont remplis :

- 1 - Division reproductive du travail (avec ou sans castes stériles) ;
- 2 - Chevauchement de générations ;
- 3 - Existence d'une coopération dans les soins aux jeunes.

Parmi les insectes sociaux, on compte les fourmis, les abeilles et guêpes (ordre Hymenoptera), et aussi les termites (ordre Isoptera), qui ont tous une femelle reproductrice et des ouvrières stériles et/ou soldats.



Nids de la fourmi *Solenopsis amblychila*, du termite *Reticulitermes* sp. et l'abeille *Tetragonisca angustula*.  
Photos Alex Wild ©2003, utilisation autorisée. Source : <http://www.myrmecos.net/>

Une innovation importante – exclusive des fourmis – est l'apparition de la glande métapleurale. Cette glande produit des substances antiseptiques et antibiotiques qui protègent la surface du corps, ainsi que l'intérieur du nid. La glande métapleurale est considérée comme un caractère universel et phylogénétiquement ancien et on la trouve chez les fourmis fossiles les plus anciennes (Brown, 1968; Grimaldi et al., 1997; Hölldobler et Engel-Siegel, 1985 ("1984")). Ces glandes sont absentes chez quelques espèces de fourmis, où elles sont atrophiées ou ont même complètement disparues. C'est le cas de nombreuses espèces arboricoles comme celles des genres *Oecophylla*, *Polyrachis* et *Dendromyrmex* et aussi la plupart des espèces du genre *Camponotus* (Hölldobler et Engel-Siegel, 1985 ("1984")). Pourtant, ces fourmis ne restent pas démunies de défenses, elles utilisent des sécrétions issues d'autres glandes avec des propriétés antimicrobiennes similaires. Par exemple, chez les fourmis de la sous-famille Formicinae, les sécrétions de la glande à poison contiennent de l'acide formique, une substance de défense capable de restreindre la croissance de bactéries

et de champignons. Pour profiter de ces propriétés, quelques oiseaux se servent de ces fourmis pour se débarrasser de leur parasites, on parle de « formicage » (Revis et Waller, 2004). D'autres fourmis présentent une réduction de l'activité sécrétrice de leur glande métapleurale, ce sont les fourmis parasites. Ce phénomène a été bien étudié chez la fourmi champignonnette *Acromyrmex echinator* et son parasite *Acromyrmex insinator*. L'espèce parasite a évolué dans l'aptitude à exploiter le système immunitaire collectif de son hôte et, profitant des sécrétions produites par l'hôte, a pu réduire l'activité de sa glande métapleurale (Sumner et al., 2003). La réduction de taille de la glande métapleurale semble être la règle chez les fourmis parasites du genre *Acromyrmex*. Ceci a été observé aussi chez *Acromyrmex ameliae*, parasite social d'*Acromyrmex subterraneus* (De Souza et al., 2007).

La défense contre les parasites étant un enjeu majeur pour la colonie, les fourmis se sont associées à des tiers équipés de moyens de protection. Il a été montré chez les fourmis champignonnettes que la poudre blanche recouvrant la partie ventrale du thorax de la cuticule des ouvrières était constituée de bactéries symbiotiques du genre *Pseudonocardia*, capables de produire des antifongiques permettant à la fourmi de lutter contre un champignon du genre *Escovopsis*, parasite de leurs champignons symbiotiques. Cette poudre n'avait pas attiré l'attention des chercheurs jusqu'à une date très récente (Currie et al., 1999) et on ne connaît pas le bénéfice que peut tirer la bactérie de l'association. On connaît aussi l'exemple des abeilles qui utilisent des résines végétales comme élément de construction de leurs nids, ayant aussi une action antimicrobienne (Miorin et al., 2003), et les fourmis des bois *Formica paralugubris* qui récoltent la résine des sapins et l'incorporent dans leur nid. Cette défense chimique protège la colonie contre l'attaque de pathogènes (Chapuisat et al., 2007).

Les invertébrés, n'ayant pas un système immunitaire adaptatif comme celui des vertébrés, ont développé un système immunitaire inné, basé sur la détection de structures moléculaires qui sont spécifiques à un certain type de microorganisme, par exemple des polysaccharides ou des peptidoglycanes des membranes bactériennes (Iwanaga et Lee, 2005). Actuellement, les composants moléculaires qui participent à la défense immunitaire innée chez les insectes sont bien connus, surtout chez le modèle *Drosophila melanogaster* où de grandes avancées ont été effectuées (Lemaitre et Hoffmann, 2007). On trouve de fortes similarités entre le système immunitaire inné des vertébrés et celui des invertébrés. Il s'agit de réponses humorales (production de peptides antimicrobiens et encapsulation) et cellulaires (phagocytose et encapsulation), donc leur compréhension chez les insectes pourrait aider à mieux connaître une partie de notre propre système immunitaire (Salzet, 2001) (Gillespie et al., 1997). L'encadré 2 donne une vision générale de ces multiples défenses.

Les insectes sont protégés par leur cuticule lipidique qui diminue l'évaporation (Blomquist et Howard, 2003). La cuticule constitue aussi une barrière physique difficile à franchir par la plupart des microorganismes mais en plus les lipides ont des propriétés antimicrobiennes (Larsson et al., 1975a; Larsson et al., 1975b).

La mélanisation est une défense immunitaire innée majeure chez les insectes (Cerenius et Soderhall, 2004). Dès que l'insecte est blessé, il apparaît une région noirâtre autour de la blessure. Cette réaction a lieu grâce à l'activation de la prophénoloxydase en phénolydase (la forme active de l'enzyme) qui finira par la production de mélanine (Encadré 3). Les effets cytotoxiques de la mélanine, ainsi que d'autres intermédiaires chimiques produits au long du processus de mélanisation (quinones), contribuent à la mort des parasites et pathogènes (Gillespie et al., 1997).

L'invasion de l'hémocèle par des microorganismes induit la production de peptides antimicrobiens qui sont libérés dans l'hémolymphe. Ils sont synthétisés par les cellules du corps gras mais ils peuvent aussi être produits en quantités mineures par les hémocytes et d'autres tissus. Leur production est très répandue chez tous les êtres vivants, on en connaît déjà plus de 900 aujourd'hui. L'action de ces peptides s'effectue principalement par la rupture de la membrane cellulaire, mais peut aussi empêcher les processus métaboliques comme la synthèse d'ADN. Leur spécificité dirigée vers les microorganismes ainsi que l'absence surprenante de résistance<sup>1</sup> en font un champ de recherche prometteur pour remplacer l'utilisation d'antibiotiques conventionnels chez l'homme (Parisien et al., 2008). Plusieurs peptides antimicrobiens ont été décrits chez les insectes, mais chez les fourmis *Formica rufa* et *F. aquilonia* on ne connaît que deux défensines (Taguchi et al., 1998; Viljakainen et Pamilo, 2005). La recherche des gènes de ces peptides antimicrobiens devrait permettre de progresser rapidement dans ce domaine, c'est ainsi que l'on a identifié récemment quatre peptides chez les bourdons (Choi et al., 2008).

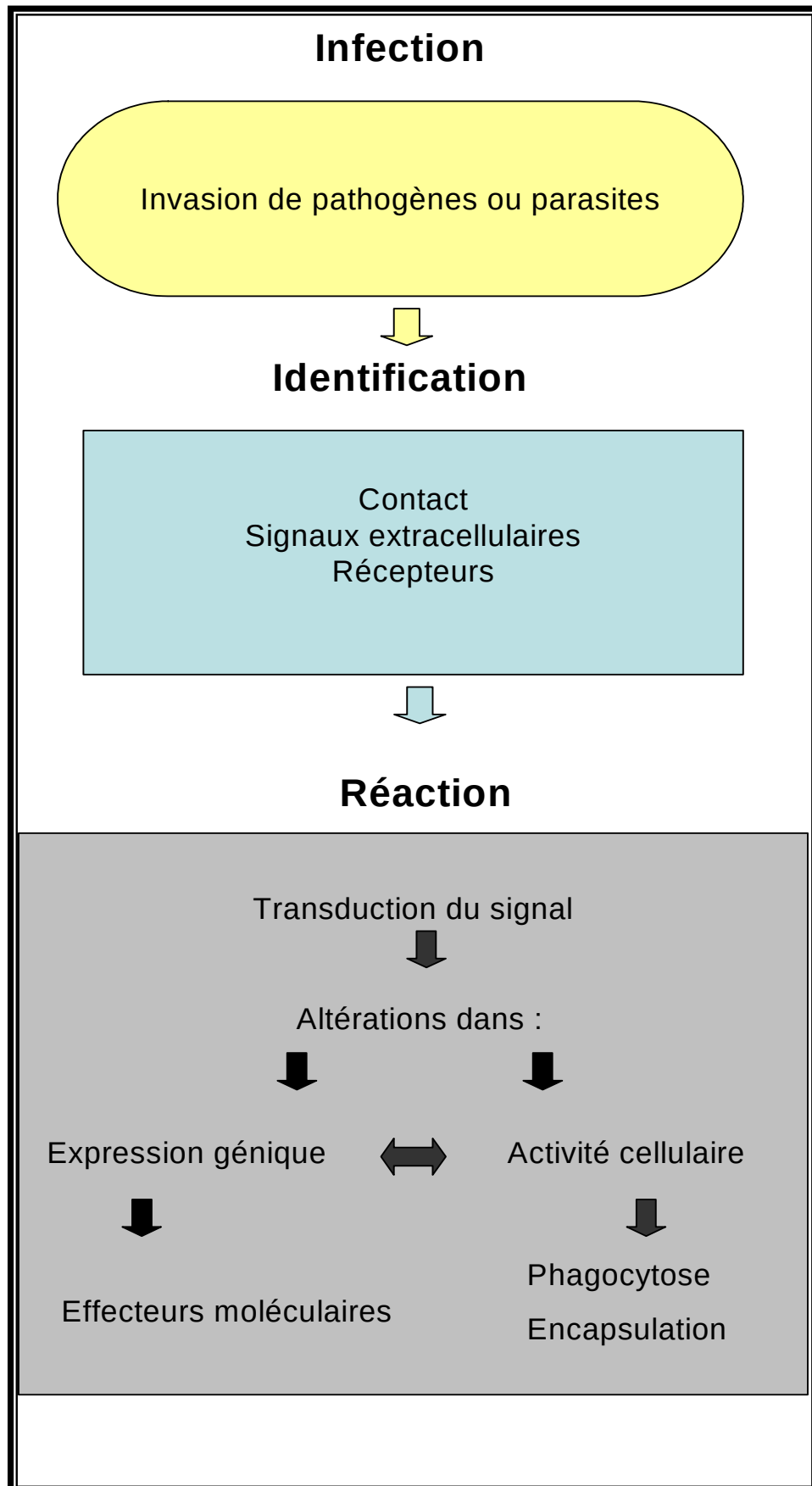
Les défenses cellulaires sont connues depuis plus d'un siècle et comprennent souvent des changements des hémocytes au niveau morphologique, patterns d'agrégation, d'adhérence et de migration et l'altération proportionnelle des différents types (Gillespie et al., 1997). Deux classes d'hémocytes sont prédominantes chez les insectes : les plasmatocytes et les granulocytes. Les hémocytes des insectes ont une origine mésodermique, ils sont dérivés de

---

<sup>1</sup> Quelques bactéries sont connues pour produire des enzymes protéolytiques, comme quelques souches de *Pseudomonas*, *Serratia* et *Staphylococcus*, lesquelles sont généralement moins susceptibles voir même résistantes aux peptides antimicrobiens. Dans ce cas, les chercheurs envisagent des changements dans leur structure permettant de contourner la résistance bactérienne et ainsi les utiliser dans des traitements médicaux. Boman, H.G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* 254:197-215.

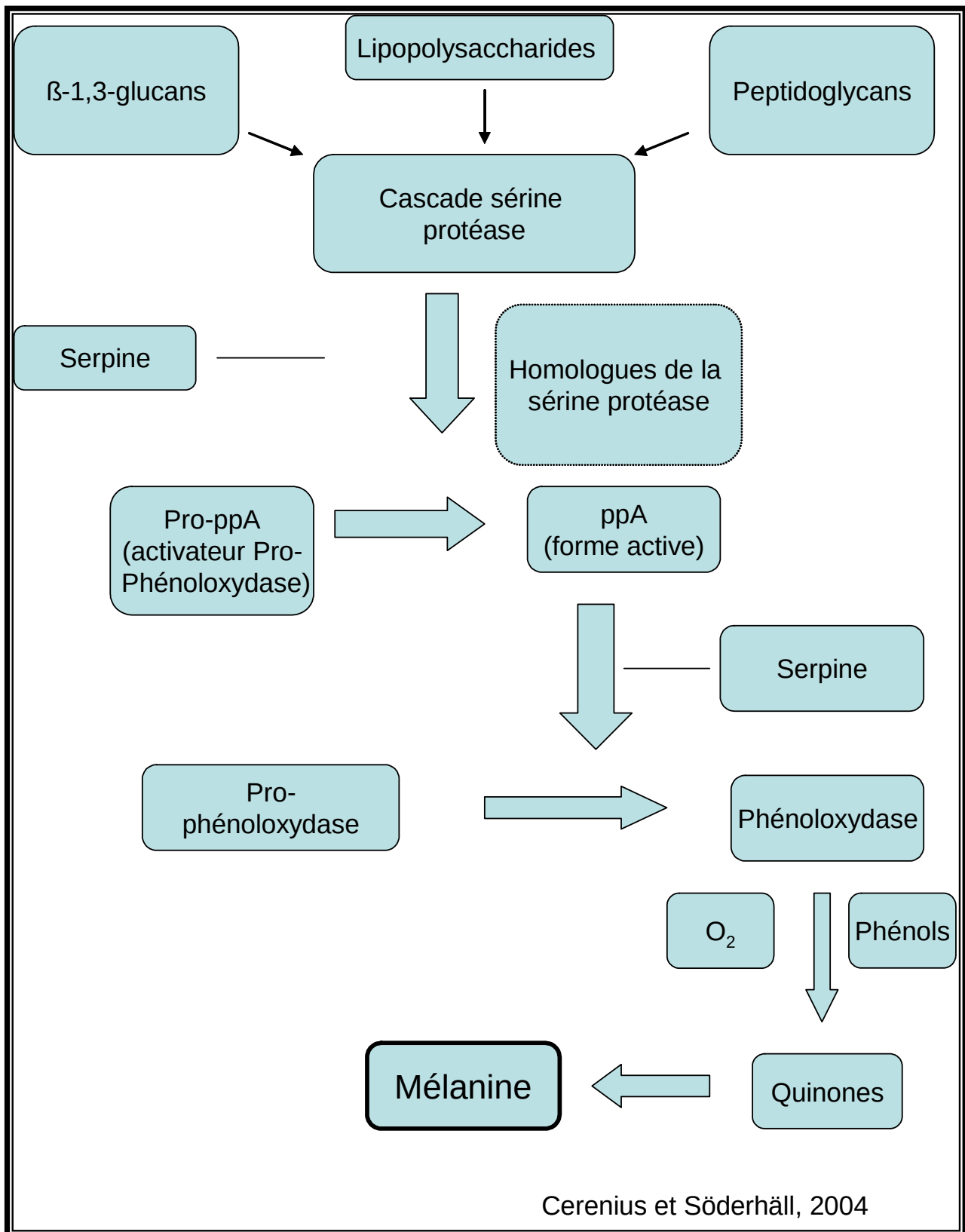
cellules souches qui se différencient en lignées spécifiques identifiées par leur morphologie, leur fonction et leurs marqueurs moléculaires (Lavine et Strand, 2002). Les réponses des hémocytes sont variées et progressives, comprenant une réaction primaire - la phagocytose - ensuite la formation de nodules et finalement l'encapsulation. L'action des réponses cellulaires et humorales semble être bien coordonnée et intégrée. Pour le chercheur, ces réactions ont l'avantage d'être visibles et facilement mesurables.

Encadré 2 : Séquence d'événements après une infection qui mènent à la réponse immunitaire chez les insectes.





Encadré 3 : Séquences d'événements biochimiques aboutissant à la production de la mélanine chez les insectes.



## Immunité sociale

Parallèlement aux bénéfices que la socialité apporte aux insectes, comme une meilleure performance dans l'exécution de tâches plus complexes et plus d'efficacité dans l'occupation de différentes niches écologiques, elle est aussi associée à une augmentation des coûts liés à une augmentation des risques de transmission d'infections. Le fait que ces colonies possédant quelques milliers, voire millions d'individus chez quelques espèces (Jonkman, 1979; Raignier et Boven, 1955), soient plus exposées aux risques d'infections peut signifier une force contraire à la vie en groupe. Pourtant, des études viennent montrer que ces sociétés peuvent compter avec une autre forme de protection, issues des propriétés émergentes de ces colonies. Il existe plusieurs exemples, dans différents domaines scientifiques, de propriétés qui émergent des interactions des entités qui composent elles-mêmes le système (Aziz-Alaoui et Bertelle, 2006). Par exemple, la molécule d'air ne constitue pas un cyclone, une espèce isolée ne forme pas la chaîne alimentaire, un neurone tout seul n'est pas la conscience. Ici, cette nouveauté c'est l'immunité sociale. Elle est fruit de la coopération entre individus pour contrer les risques de transmission d'infections qui apparaissent à cause de la propre socialité et de la vie en groupe (Cremer et al., 2007).

Quelques études montrent que vivre en groupe diminue les probabilités de transmission de maladies infectieuses. Chez les fourmis champignonnistes du genre *Acromyrmex*, les ouvrières restées en groupe avec des congénères ont une survie plus importante que celle d'ouvrières isolées, face à une contamination par le champignon entomoparasite *Metarhizium anisopliae* (Hughes et al., 2002). Dans ce cas, il semble que l'allotoilettage et les sécrétions antimicrobiennes produites par les congénères jouent un rôle très important dans la résistance contre les parasites. Mieux comprendre ces comportements semble crucial pour la réussite d'un contrôle biologique des fourmis ravageuses et envahissantes. L'échec du contrôle d'espèces comme *Solenopsis invicta* avec des ennemis naturels (malgré les millions de dollars dépensés par les américains) peut être attribué en partie aux comportements prophylactiques des ouvrières (Oi et Pereira, 1993). Ces comportements incluent, par exemple, les léchages entre individus, les sécrétions antimicrobiennes, les mesures d'hygiène du nid, le déplacement des colonies ou le rejet des individus malades. Des mécanismes de facilitation sociale ont été montrés aussi chez les Isoptera. Quand les termites sains sont placés avec des termites préalablement immunisés, ils augmentent significativement leur capacité à résister aux maladies (Traniello et al., 2002).

Selon Alexander (Alexander, 1974) les animaux qui vivent en groupes devraient être plus susceptible aux parasites et donc, devraient investir plus de temps et plus d'énergie pour

contrer ces attaques. Cette hypothèse a été testée chez six paires de Lepidoptera, incluant toujours pour chaque paire une espèce solitaire et une autre grégaire (Wilson et al., 2003). Les résultats ont révélé le contraire de ce qui a été prédit : les espèces grégaires investissent moins de ressources en défenses immunologiques que les espèces solitaires. Une explication est que les risques d'infections seraient comparables pour les espèces grégaires et pour les solitaires, mais les espèces grégaires détiendraient moins d'énergie disponible car elles investissent plus d'énergie dans d'autres fonctions, comme celles liées à vie en groupe. Ainsi la protection issue de la vie en groupe peut contrebalancer le manque de défenses immunitaires.

Le séquençage du génome d'*Apis mellifera* corrobore en partie cette idée que les insectes sociaux investissent moins en défenses immunologiques (Weinstock et al., 2006). L'analyse du génome a révélé que l'abeille comporte moins de gènes liés aux défenses immunitaires comparé aux espèces solitaires de l'ordre Diptera, incluant les gènes de reconnaissance de corps étrangers, les gènes de signalisation et les effecteurs de la réponse immunitaire (Evans et al., 2006). Il s'agit du premier et unique génome séquencé d'un insecte social, et ces données montrent une perspective intéressante pour chercher à mieux comprendre l'évolution du système immunitaire chez les insectes sociaux. Cependant, moins de gènes impliqués dans les réponses immunitaires pourrait à la fois être compensé par des sécrétions antimicrobiennes plus fortes et peut-être ayant comme cibles une gamme plus large de microorganismes. Récemment, il a été montré que, chez les apidés, la force des défenses antimicrobiennes était positivement corrélée au degré de socialité du groupe, mesuré comme la taille et le niveau de parentalité (Stow et al., 2007).

Les hyménoptères sociaux ont par ailleurs une plus faible diversité génétique intra-coloniale que la moyenne populationale, conséquence de leur mode particulier de reproduction : l'haplodiploïdie<sup>2</sup>. Ils devraient alors être encore plus vulnérable aux attaques de parasites. Pourtant, cette faiblesse peut être compensée par l'accouplement avec plusieurs mâles (polyandrie) ou bien la présence de plusieurs reines au sein d'une même colonie (polygynie), un caractère trouvé chez plusieurs espèces d'insectes sociaux, hyménoptères et isoptères (Keller, 1993). L'importance de telles adaptations du comportement pour faire face aux pressions parasitaires (S. Liersch, 1998; Schmid-Hempel et Crozier, 1999) a été empiriquement démontrée chez les fourmis *Acromyrmex* (Hughes et Boomsma, 2004). La

---

<sup>2</sup> Mode de détermination du sexe par lequel les mâles sont, presque toujours, obtenus à partir du développement d'un œuf vierge par parthénogenèse arrhénotoque. Les œufs fécondés sont, pour leur part, à l'origine d'individus de sexe femelle. Quand les œufs vierges donnent des ouvrières femelles (un cas rare chez les fourmis), on parle de parthénogenèse thélytoque (Passera et Aron, 2005).

polyandrie augmente la diversité génétique des colonies et cette diversité favorise une plus forte résistance au champignon parasite *Metarhizium*. Justement, les insectes sociaux ont un répertoire de comportements dits prophylactiques. Ceux-ci incluent l'autotoilettage, l'allotoilettage et la restriction d'accès de quelques compartiments du nid. Par exemple, l'accès aux chambres des cocoons, des œufs et des larves peut être limité à un groupe spécifique d'ouvrières. On observe aussi chez les fourmis le rejet de cadavres, un comportement appelé nécrophorie, qui est le moyen pour la colonie se débarrasser rapidement de toute congénère morte, évitant ainsi la contamination par des microorganismes saprophytes (Ataya et Lenoir, 1984).

## **Endosymbioses**

Les associations symbiotiques entre organismes procaryotes et organismes eucaryotes sont très répandues dans la nature. Le terme symbiose a été conçu pour décrire l'association intime entre deux espèces, dont l'une, le symbiote occupe l'habitat fourni par son hôte (Begon et al., 2006). Selon ces auteurs, les parasites sont normalement exclus de cette catégorie puisque elle devrait être réservée aux interactions où il existe au moins la suggestion de mutualisme. Une relation mutualiste est simplement une relation dans laquelle les organismes de différentes espèces interagissent pour leur bénéfice mutuel. Chez les insectes, des estimations donnent environ 10% des espèces nécessitant des bactéries mutualistes pour leur survie (Wernegreen, 2002) et ce chiffre est en augmentation très rapide.

Si la symbiose exprime la cohabitation entre différents espèces, le terme endosymbiose exprime une condition topologique, c'est-à-dire, un organisme vivant à l'intérieur d'un autre. L'encadré 4 donne quelques définitions importantes concernant les endosymbioses.

Les organismes endosymbiotes peuvent se trouver dans des cavités corporelles ou situés dans des cellules spécialisées - les bactériocytes - libres ou à l'intérieur de vacuoles. Un exemple singulier est la bactérie endosymbiotique de la tique *Ixodes ricinus*. Des études ont montré que '*Candidatus* Midichloria mitochondrii' du cytoplasme, pourrait être trouvé aussi dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie des cellules ovariennes (Sassera et al., 2006).

Les endosymbiotes primaires (voir encadré 4) partagent quelques syndromes en commun : co-évolution avec leurs hôtes, réduction du génome, génome AT biaisé et évolution moléculaire accélérée (Wernegreen, 2002). Le processus de réduction du génome chez un endosymbiote primaire a généré la bactérie avec le plus petit génome jamais connu,

*Carsonella ruddii*, endosymbiote de l'hémiptère psyllide *Pachypsylla venusta*, a un génome de 160 Kb avec 182 gènes prédits (Nakabachi et al., 2006). La perte de plusieurs gènes essentiels à la vie pourrait signifier que cette espèce a accédé au statut d'organelle (Tamames et al., 2007).

Les effets des endosymbiotes primaires sur leurs hôtes sont assez variables, mais dans la plupart des cas, ils semblent jouer un rôle comme complément dans la nutrition. Plusieurs exemples le confirment : *Buchnera* chez les aphides (Bermingham et al., 2007), *Carsonella* chez les psyllides (Nakabachi et al., 2006), *Portiera* chez la mouche blanche (Ruan et al., 2006), *Tremblaya* chez les cochenilles farineuses (Baumann, 2005) ou encore *Baumannia* chez les cicadelles pisseuses (Wu et al., 2006). Tous ces hôtes appartiennent aux sous-ordres Sternorrhyncha et Auchenorrhyncha des Hemiptera, lesquels partagent une propriété commune : ce sont des insectes suceurs de sève. Pour avoir une diète très simplifiée, limitée en azote, ils dépendent de l'approvisionnement de cet élément par leurs endosymbiotes. Un autre exemple comparable se trouve chez les mouches tsé-tsé (*Glossina*) qui ont aussi une diète limitée car elles s'alimentent exclusivement de sang. Leurs endosymbiotes primaires, les bactéries *Wigglesworthia*, compensent leurs carences alimentaires (Akman et al., 2002). Outre les effets nutritifs, des implications des endosymbiotes sur le développement et la reproduction de leurs hôtes ont été décrites (Costa et al., 1997; Dale et Welburn, 2001; Hardie et Leckstein, 2007). Toutefois, il n'est pas facile de déterminer si ces effets sont directs ou bien secondaires, comme une conséquence de l'état nutritif de l'insecte.

### ***Blochmannia***

*Blochmannia*<sup>3</sup>, l'endosymbiote primaire des fourmis charpentières (*Camponotus*), a été observé en microscopie optique pour la première fois par Blochmann en 1882 (Blochmann, 1892) mais n'a été formellement décrite que récemment grâce aux approches de la biologie moléculaire (Sauer et al., 2000). Cette endosymbiose est considérée comme la première observation d'association d'une bactérie intracellulaire avec un insecte. Elle s'agit d'une bactérie du groupe  $\gamma$ -Proteobacteria, phylogénétiquement proche d'autres

---

<sup>3</sup> Le concept '*Candidatus*' est utilisé pour nommer des organismes bien caractérisés mais qui ne peuvent pas être cultivés (Murray, R.G.E., and E. Stackebrandt. 1995. Taxonomic Note - Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described prokaryotes. International Journal of Systematic Bacteriology 45:186-187.). Exemple d'un nom officiel: '*Candidatus* Blochmannia floridanus'. *Candidatus* (en italique), le nom(s) subséquent(s) en type Roman, le nom générique débutant avec une majuscule, et le nom entier entre les marques ' '. Souvent, le nom générique est simplement cité comme *Blochmannia*.

endosymbiotes primaires des aphides et de la mouche tsé-tsé (Sauer et al., 2000). Elle est une bactérie endosymbiote obligatoire transmise à la descendance par voie ovocytaire (Fig. 1). On parle de transmission verticale. Sa fonction chez la fourmi n'est pas très claire : son élimination par un antibiotique n'a pas causé d'effets délétères, du moins détectables, sur la fourmi (Sauer et al., 2002). Donc, l'apparente capacité de la fourmi à vivre sans la bactérie suscite la question de savoir si elle est nécessaire pour leur survie ou si sa présence est une relique d'un passé mutualiste (Wernegreen et al., 2003). Mais le fait qu'on trouve l'endosymbiote chez toutes les espèces de *Camponotus* étudiées jusqu'ici fait supposer qu'elle a un rôle important pour son hôte, et ses effets peuvent être au-delà de la simple complémentarité nutritive puisque plusieurs *Camponotus* sont omnivores (Dasch, 1975; Hölldobler et Wilson, 1990).

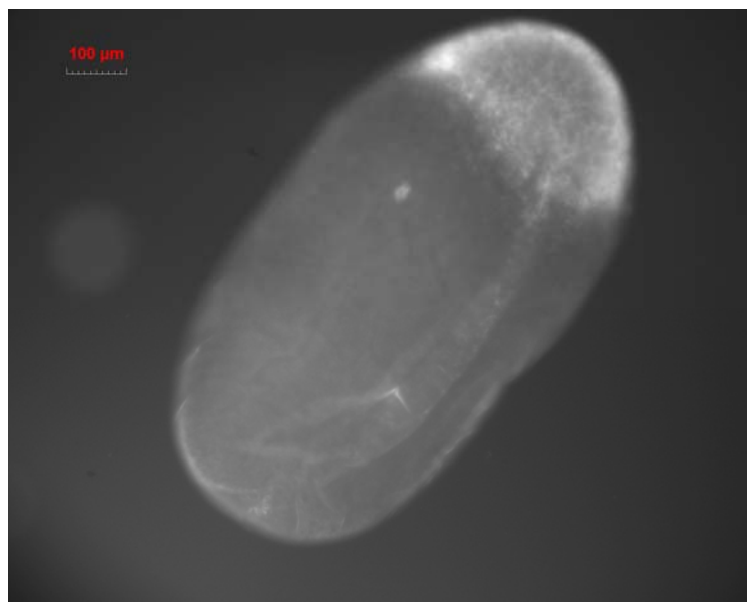


Figure 1- Détection de *Blochmannia*, par hybridation in situ, dans l'œuf de *C. festinatus*, photo communiquée par Diana Wheeler. Les bactéries sont concentrées dans la partie apicale de l'œuf, plus claire.

Le genre de fourmis *Camponotus* est présent sur tous les continents et régions biogéographiques et compte à peu près 1000 espèces (Bolton, 1995a), un nombre toujours croissant avec la description de nouvelles espèces essentiellement tropicales. Les études portant sur la relation *Camponotus/Blochmannia* pourraient nous aider à mieux comprendre le succès écologique et évolutif de cet important groupe d'insectes.

## **Les endosymbiotes et le système immunitaire de leurs hôtes**

Les endosymbiotes interfèrent avec le système immunitaire des insectes hôtes de plusieurs façons. *Wolbachia*, une bactérie endosymbiote obligatoire ( $\alpha$ -Proteobacteria) qui infecte un spectre très large d'invertébrés, est plus connue pour manipuler la reproduction de leur hôtes (Rousset et al., 1992; Stouthamer et al., 1999) et ces effets peuvent varier selon l'espèce infectée (Bouchon et al., 1998). Mais elle peut aussi agir sur la réponse immunitaire cellulaire de son hôte, exemple chez la mouche *Drosophila simulans*, contre les œufs du parasitoïde *Leptopilina heterotoma* (Fytrou et al., 2006). Par contre, son élimination chez le parasitoïde, favorise le développement des œufs en larves, à l'intérieur de la mouche.

D'un autre côté, les endosymbiotes secondaires de l'aphide *Acyrtosiphon pisum* lui confèrent une résistance aux attaques des parasitoïdes. De la même façon, *Sodalis glossinidius*, l'endosymbiote secondaire de la mouche tsé-tsé (*Glossina morsitans morsitans*), peut potentialiser la susceptibilité de la mouche au *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Dale et Welburn, 2001).

Pourtant, nous en connaissons très peu les effets des endosymbiotes primaires sur le système immunitaire de leurs hôtes. Récemment, il a été montré que l'endosymbiote primaire de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera : Curculionidae) peut activer les protéines responsables de la détection de peptidoglycanes dans certaines phases du développement de l'insecte, ce qui peut entraîner des conséquences sur son immunité (Anselme et al., 2006).

## **Reconnaissance coloniale et symbiotes**

Les insectes sociaux discriminent leurs congénères d'autres « étrangères » par l'utilisation de mixtures chimiques complexes, spécifique de la colonie. Plusieurs études confirment que les hydrocarbures sont la principale classe de composés chimiques impliqués dans cette reconnaissance (Blomquist et al., 1998; Lahav et al., 1999; Lenoir et al., 1999; Wagner et al., 2000). Ces substances sont en partie génétiquement déterminées (Vander Meer et Morel, 1998) mais ont aussi une composante environnementale (Jutsum, 1979; Jutsum et al., 1979; Richard et al., 2004). Des études menés sur les fourmis champignonnistes *Acromyrmex* indiquent que leur champignon symbiote peut contribuer à la formation d'une odeur coloniale plus complexe (Richard et al., 2007; Viana et al., 2001). Le même phénomène pourrait se passer chez les termites, dont les produits des bactéries symbiotes de l'intestin contribuent à la reconnaissance coloniale (Matsuura, 2001; Minkley et al., 2006). Mais

jusqu'ici aucune étude, à notre connaissance, n'a étudié le rôle des endosymbiotes dans la reconnaissance coloniale chez les fourmis.

Encadré 4: Quelques concepts élémentaires sur les endosymbioses,  
d'après Wernegreen et al. (2002)

**Mutualiste obligatoire**

Un symbiote bénéfique qui vit exclusivement dans l'hôte et dépend de lui pour survivre. Les endosymbiotes obligatoires vivent dans des cellules de l'hôte et incluent diverses bactéries associées aux insectes.

**Mutualiste facultatif**

Un symbiote bénéfique qui s'associe avec son hôte, mais peut aussi mener une vie libre. Des bactéries mutualistes facultatives incluent *Vibrio fischeri* chez les calmars et *Rhizobium* spp. chez les légumes, tous les deux ayant une phase libre dans leur cycle de vie.

**Cospéciation**

L'évolution parallèle de deux taxa associés (tels que l'hôte et le symbiote), telle que les événements de spéciation des deux taxa sont couplés. Les phylogénies congruentes entre l'hôte et le symbiote suggèrent fortement la cospéciation (voir Fig. 2, l'exemple de *Blochmannia/Camponotus*) mais d'autres hypothèses alternatives peuvent être prises en compte (facteurs géographiques, par exemple).

**Proteobacteria**

Il s'agit d'un phylum du domaine Eubacteria, enfermant plusieurs sous-divisions : alpha ( $\alpha$ ), bêta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ) et epsilon ( $\epsilon$ ) Proteobacteria.

**Bactériocyte**

Le bactériocyte, ou mycétocyte, est une cellule spécialisée, trouvée chez plusieurs groupes d'insectes, qui héberge des bactéries endosymbiotiques.

**Endosymbiotes primaires**

Ils se sont associés avec les insectes au cours de millions d'années (souvent plus de 10 millions d'années), formant une association obligatoire avec leurs partenaires, avec lesquels ils exhibent une cospéciation.

**Endosymbiotes secondaires**

Ils sont des bactéries facultatives chez les insectes et sont souvent situées dans des cellules syncytiales proches des bactériocytes et dans d'autres types de tissus de l'insecte. Ils sont considérés comme non essentiels à la survie de leur hôte et peuvent se transférer entre individus de la même espèce et d'espèces différentes.



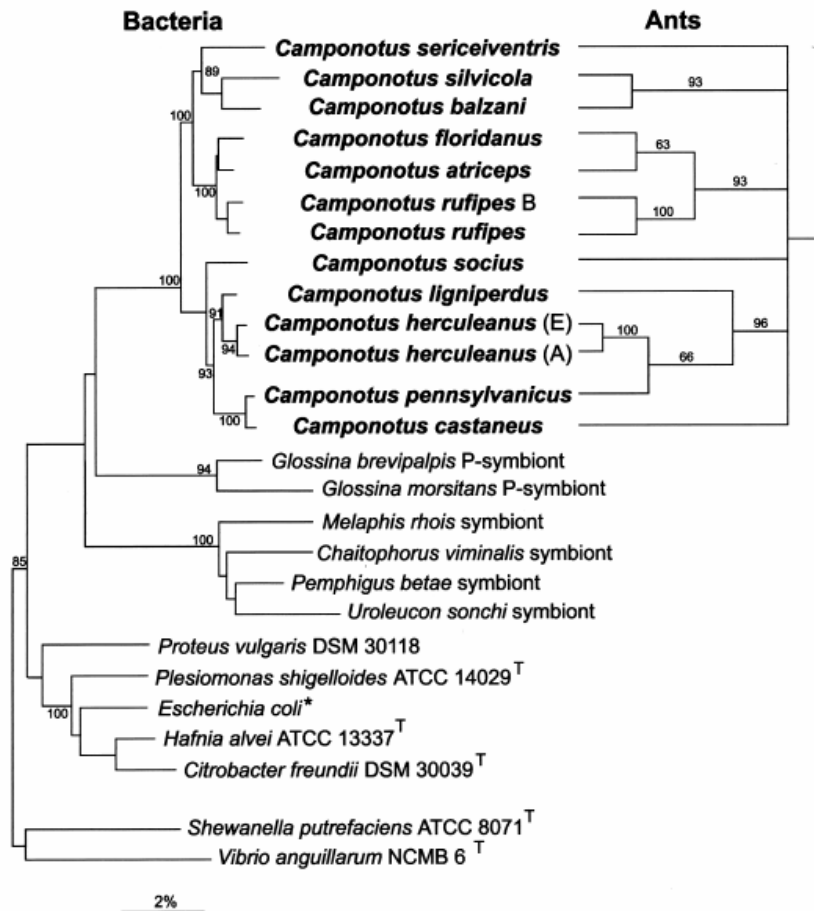


Figure 2 – Comparaison entre les arbres phylogénétiques des endosymbiotes et de leur hôtes : fourmis du genre *Camponotus*, d'autres endosymbiotes comme ceux des aphides et de la mouche tsé-tsé et autres bactéries libres. D'après Sauer et al. (2000).

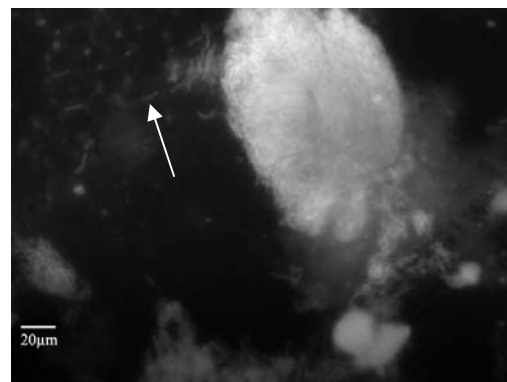
## Lignes générales de la thèse

Cette thèse a été réalisée sur la fourmi *Camponotus fellah* (Fig. 3), espèce qui s'élève facilement au laboratoire, que nous connaissons bien et qui présente des relations sociales intenses. C'est une espèce monogyne formant des colonies très populeuses et elle est commune au Proche-Orient. Une même colonie de *C. fellah* peut occuper généralement plusieurs nids très dispersés et répartis à proximité de buissons où elles élèvent des pucerons. Il est possible de récolter des fondatrices juste après le vol nuptial au mois de mars en Israël. La taille de cette espèce facilite les observations comportementales, les injections des stimulants du système immunitaire et la récolte de l'hémolymph pour mesurer l'immunocompétence. Les fourmis *Camponotus* sont l'un des plus importants genres de fourmis, comptant de nombreuses espèces qui colonisent divers habitats. Nous nous sommes intéressés à étudier les traits de vie liés au système immunitaire, qui pourraient, conjointement, expliquer leur succès évolutif : (1) Les modifications des interactions sociales au sein de la colonie sous l'influence d'une réponse immunitaire, (2) la réponse immunitaire et (3) les implications de son endosymbiote primaire *Blochmannia* (Fig. 4). Les hypothèses de travail seront présentées au fur et à mesure.



Figure 3 – Une jeune colonie de *Camponotus fellah* avec la reine et quelques ouvrières. On peut voir une trophallaxie entre deux ouvrières, un comportement remarquable chez ces espèces.

Figure 4 – Bactériocyte de *Camponotus fellah* rompu, avec plusieurs bactéries libres dans l'image, visibles par la technique de FISH (Fluorescent *in situ* hybridization), un bactériocyte **Bac** et la flèche montre une bactérie.



Première partie

Relations sociales chez les fourmis : corrélats  
immunologiques

Article 1 (Journal of Insect Physiology, sous presse,  
doi:10.1016/j.jinsphys.2008.03.001)

## **1 - Problématique**

La fourmi est un insecte qui ne peut vivre que dans sa société avec des congénères avec lesquels elle entretient des relations nombreuses comme des léchages interindividuels et des échanges en bouche à bouche (appelés trophallaxies). On a vu dans l'introduction que ces trophallaxies sont plus qu'un simple échange alimentaire, elles permettent aussi de partager une odeur sociale commune et de maintenir la motivation sociale, garante de la cohésion du groupe. Cependant, ces comportements sociaux sont coûteux. Quand un individu est malade, il doit répondre en développant des réactions physiologiques et/ou comportementales (voir introduction) qui ont aussi un coût énergétique. Nous avons posé l'hypothèse que l'individu est alors confronté à des « choix » (trade-off) : où investir d'avantage son énergie ? À combattre la maladie ou dans des activités sociales ?

## **2 – Méthodes**

Cette étude a consisté à simuler une maladie en stimulant le système immunitaire inné par injection de peptidoglycanes (PGN) et de lipopolysaccharides LPS, classiquement utilisés chez les insectes. Ensuite, nous avons quantifié les interactions sociales de l'individu ainsi traité. Pour évaluer l'efficacité de la stimulation du système immunitaire inné de la fourmi, nous avons réalisé 1) des tests d'inhibition bactérienne sur plaque de lyse (action des peptides antimicrobiens) et 2) la réponse à l'implantation de fils de nylon (réponse d'encapsulation).

## **3 – Résultats des injections de peptidoglycanes (article 1)**

L'injection de peptidoglycanes déclenchait la production de substances antimicrobiennes, bien probablement des peptides antimicrobiens (Art. 1, Fig. 1, p. 46). Elle entraînait la production de ces peptides pendant 4 jours, ensuite on retombait au niveau des contrôles non infectés. De manière similaire, les fourmis simplement piquées avec du Ringer montraient exactement la même réponse. Donc, il n'y avait pas de différences au niveau de la production des peptides antimicrobiens entre les fourmis traitées et les fourmis contrôles, montrant que cette réponse peut avoir un spectre d'action plus large, non spécifique. Au contraire, l'injection de peptidoglycanes a diminué le taux d'encapsulation de fils de nylon comparé aux fourmis injectées avec la solution de Ringer (Art. 1, Fig. 2, p. 47). Donc, les effets d'une solution neutre de Ringer et une solution avec des parois de microorganismes ne sont pas tout à fait les mêmes. Une partie des mécanismes liés à l'encapsulation (cellulaires et enzymatiques) a été mobilisée en réponse aux peptidoglycanes et n'est donc plus disponible.

Le développement d'une réponse immunitaire ne s'est pas fait au détriment des relations sociales entre ouvrières congénères. Bien au contraire, les fourmis immunisées ont augmenté leur taux de trophallaxie avec leurs congénères (Art. 1, Fig. 3a, p. 48) pendant les premières 24 heures, avant de revenir à un taux comparable aux contrôles au bout de 48 heures (Art. 1, 3b, p. 49). Notre hypothèse de trade-off réponse humorale/réponse comportementale n'a donc pas été vérifiée. Cela va tout à fait dans le sens de la prophylaxie sociale (Cremer et al., 2007).

#### **4 - Les effets des injections de lypopolysaccharides**

Nous avons mesuré la réponse immunitaire chez *Camponotus fellah* après l'injection d'un autre stimulant de l'immunité, une solution de lypopolysaccharides (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa* Serotype 10 (Sigma-Aldrich L9143) bactérie Gram-négative. Le dosage utilisée était le même que pour les expériences avec le PGN, soit 0.5 µl d'une solution 0.5 mg/ de LPS, sur environ 16 paires de fourmis à chaque unité de temps. Nous avons pu vérifier que cet antigène a provoqué les mêmes effets que les solutions de PGN et de Ringer au niveau de la production de peptides antimicrobiens (Fig. 5). (ANOVA Factorielle, Effet Temps  $F(4,229) = 32.338$ ,  $p < 0.00001$ ; Effet Traitement  $F(2, 229) = 1.98$ ,  $p = 0.14$  (NS); Interaction Temps x Traitement  $F(8, 229) = 3.63$ ,  $p < 0.001$ ).

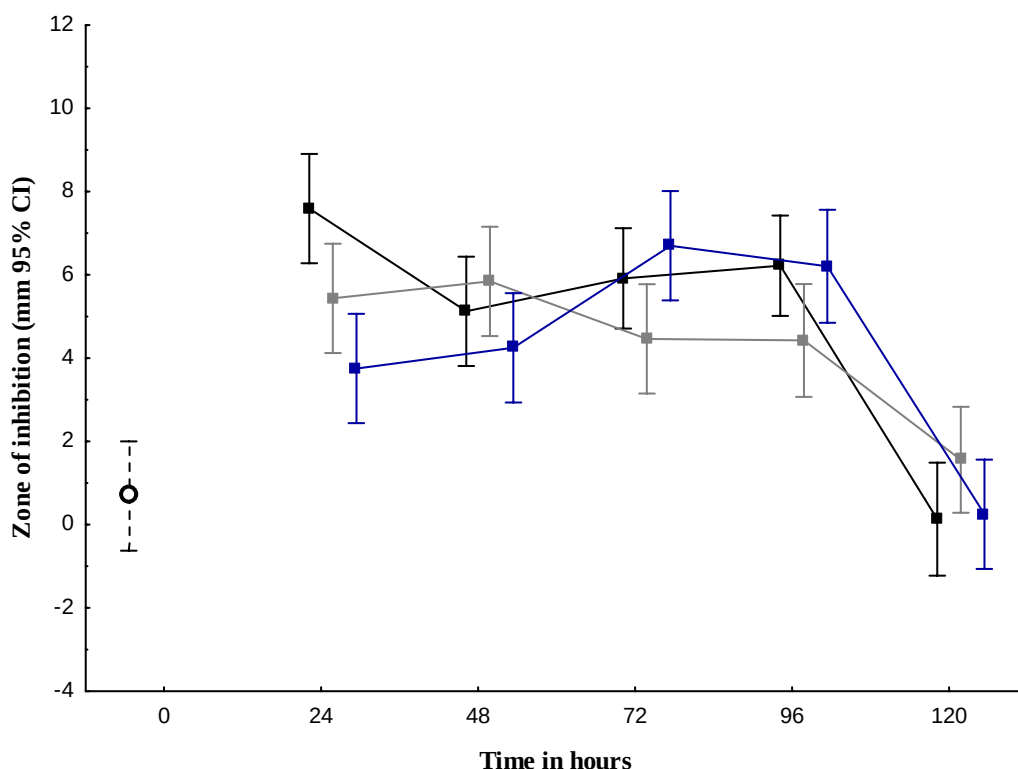


Figure 5 - Dynamique temporelle de l'activité antimicrobienne après injection d'une solution stérile de Ringer (ligne grise), d'une solution de PGN (0.5 mg/ml dans Solution Ringer, ligne noire) et d'une solution de LPS (0.5 mg/ml dans Solution Ringer, ligne bleue). Chaque point correspond à la moyenne de 14-16 paires d'individus issus de 10 colonies de *Camponotus fellah* (à chaque fois deux individus ont été utilisés pour avoir 0.5µl d'hémolymphe). Les traitements ne sont pas significativement différents entre eux, mais présentent une variation significative au long du temps. Le cercle dans le temps 0 représente la ligne de base obtenue à partir des fourmis naïves non piquées (n=16).

Ensuite, nous avons effectué les observations du comportement suite aux injections de Ringer et de LPS. Cette fois, nous avons mesuré le temps de chaque type d'interaction (inspection antennaire, allotoilettage et trophallaxie) à l'aide du logiciel Etholog 2.2 (Ottoni, 2000). Douze dyades furent réalisées, entre ouvrières issues de 4 colonies, pour les traitements suivants :

- 1 - NN : deux ouvrières naïves
- 2 - RN : une ouvrière injectée avec une solution de Ringer plus une ouvrière naïve
- 3 - RR : deux ouvrières injectées avec une solution de Ringer
- 4 - LL : deux ouvrières injectées avec du LPS
- 5 - LN : une ouvrière injectée avec du LPS et une ouvrière naïve

Les fourmis traitées (ou non) ont été ensuite isolées 24 heures et les observations réalisées après ce délai. Nous avons enregistré toutes les interactions sociales pendant 10 minutes (inspection antennaire, allotoilettage et trophallaxie). Les dyades étaient placées dans un tube de verre. Les comportements individuels comme l'autogrooming n'ont pas été pris en considération. L'expérience n'a pas été prolongée au-delà de 24 heures, puisque les effets du PGN ne duraient que 24 heures.

Pour le comportement de trophallaxie, analysé séparément, nous n'avons pas vu de différence significative entre les traitements (ANOVA,  $F(4, 55) = 1.67$ ,  $p = 0.17$ ) (Fig. 6a). Quand nous avons pris en compte la somme du temps de toutes les interactions sociales (inspection antennaire, allogrooming et trophallaxie) il y avait des différences significatives (ANOVA,  $F(4, 55) = 2.6701$ ,  $p = 0.04$ , puis LSD' Fisher) (Fig 6b). Ces résultats renforcent l'idée que les fourmis qui ont leur système immunitaire activé augmentent les interactions sociales avec ses congénères.

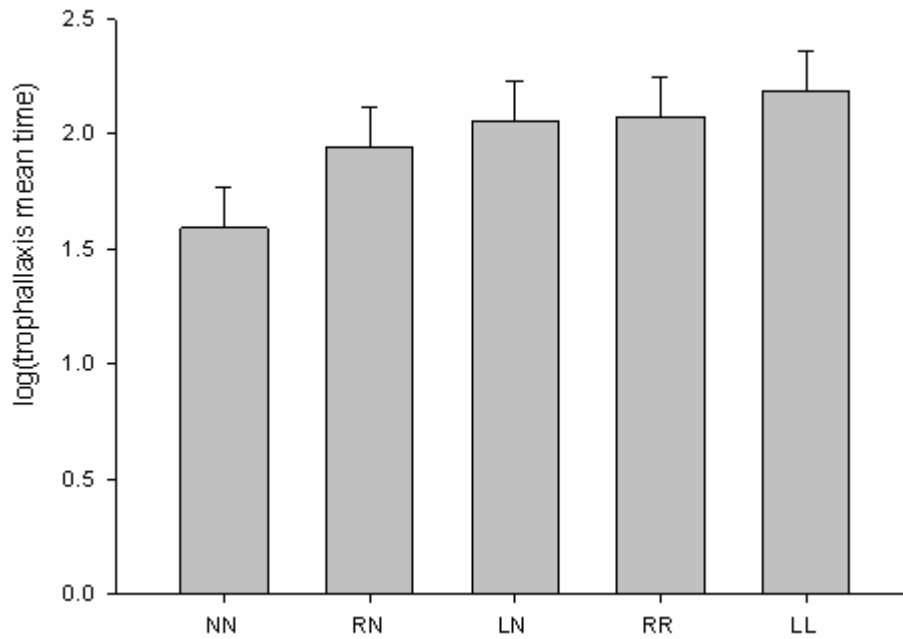


Figure 6a. Temps moyen (log Moyenne + Erreur-Type) de trophallaxie entre ouvrières naïves (NN), injectées d'une solution de Ringer et Naïves (RN), LPS et Naïves (LN), Ringer (RR) et LPS (LL). 12 observations de dyades, réalisées 24 heures après les traitements.

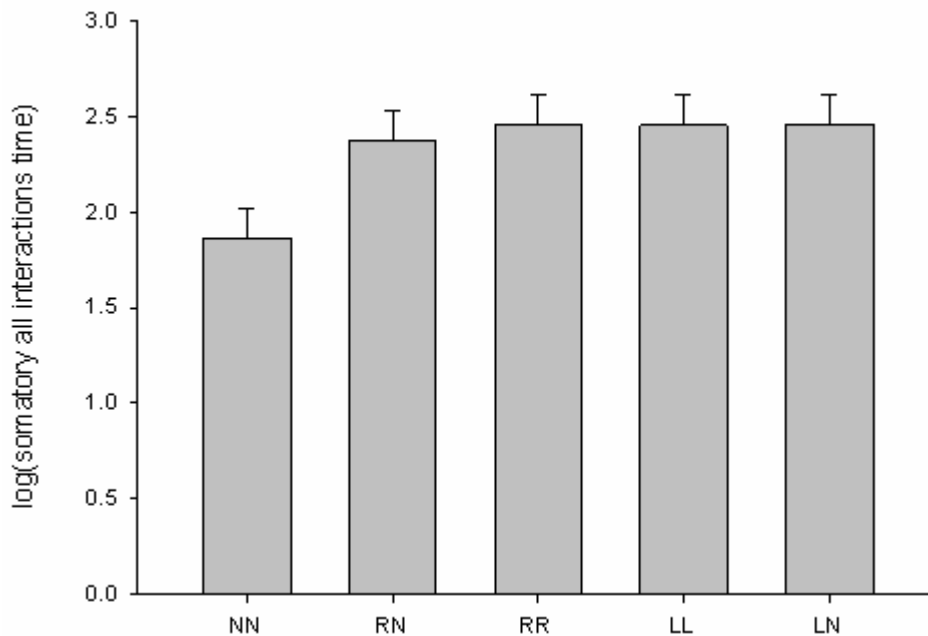


Figure 6b. Temps moyen (log Moyenne + Erreur-Type) de toutes les interactions entre ouvrières (allotoilettage, trophallaxie et inspection antennaire) entre ouvrières naïves (NN), Ringer et Naïves (RN), LPS et Naïves (LN), Ringer (RR) et LPS (LL). 12 observations de dyades, réalisées 24 heures après les traitements. Des lettres différentes dénotent des différences significatives (Fisher's LSD,  $p < 0.05$ ).



## 5 – Conclusions et perspectives

Dans le cadre de l'étude du comportement social et de l'évolution des fourmis, nous interprétons ces résultats de la façon suivante :

- Même la simple piqûre peut induire une réponse immunitaire. Cette réponse servirait à anticiper l'attaque de parasites qui pourraient s'introduire par le lieu de la piqûre. L'action plus généraliste, déclenchée par la simple blessure, servirait à éviter l'attaque des parasites moins prévisibles. Quand les bactéries sont dans un milieu adéquat, elles peuvent doubler leur population en 20 minutes (Boman, 2003). Ainsi, pour la survie de l'hôte, il est attendu que la défense active soit plus rapide que le taux de croissance de l'organisme envahisseur.
- La réponse au PGN n'est pas la même pour la production de peptides antimicrobiens et pour l'encapsulation. Dans ce cas, l'encapsulation est plus faible car il est possible que les défenses soient mobilisées par la production des peptides.
- L'augmentation des interactions sociales montre que le comportement social est important dans le processus de guérison. La trophallaxie pourrait être un moyen de prophylaxie, au moins dans le cas du PGN. Ce comportement, fortement pratiqué par les ouvrières de *Camponotus*, comme beaucoup d'autres espèces de fourmis, pourrait expliquer un phénomène étudié récemment : la prophylaxie sociale (Ugelvig et Cremer, 2007). Les fourmis naïves ayant un contact avec des individus exposés à un champignon parasite avaient une augmentation de leur survie face à une future attaque de ce même champignon. Un phénomène similaire de facilitation sociale a été décrit auparavant chez les termites (Traniello et al., 2002). La question qui se pose est quelle est l'origine de cet effet ? Une possibilité est que les substances impliquées soient transmises oralement de l'individu immunisé vers l'individu naïf. Ainsi, il est envisageable de connaître la composition du liquide échangé lors de la trophallaxie et sa possible fonction prophylactique.
- Si l'hypothèse, selon laquelle le niveau de socialité est corrélé négativement avec le nombre de gènes liés aux réponses immunitaires se confirme chez d'autres insectes sociaux, on pourrait prédire que, dans les sociétés les plus développées, les réponses immunitaires seront plus généralistes et fortes, pour contrer une large gamme de parasites non-spécialistes avec moins de gènes impliqués.

Article 1 (Journal of Insect Physiology, sous presse)

## Immune response affects ant trophallactic behaviour

**Danival José de Souza<sup>1\*</sup>, Johan Van Vlaenderen<sup>1</sup>, Yannick Moret<sup>2</sup> and Alain Lenoir<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Université François Rabelais, Avenue Monge, Parc de Grandmont 37200, Tours, France*

<sup>2</sup>*Université de Bourgogne, UMR CNRS 5561 Biogéosciences, Équipe Écologie Évolutive, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France*

\* Corresponding author: danivalbr@yahoo.com.br

**Abstract.** Sociality is associated with many benefits that have favoured its evolution in social insects. However, sociability also presents disadvantages like crowding of large numbers of individuals which may favour the spread of infections within colonies. Adaptations allowing social insects to prevent and/or control pathogen infections range from behavioural responses to physiological ones including their immune systems. In a state of infection, social interactions with nestmates should be altered in a way which might prevent its spreading. We simulated a microbial infection in workers of the ant *Camponotus fellah* by the administration of peptidoglycan (PGN) and then quantified their immune response and social interactions. PGN injections as well as control injections of Ringer solution elicited similar production of antibacterial compounds, during 1-4 days after. However, injections of PGN reduced the ability of encapsulation of a nylon implant compared to Ringer controls. The immune challenged workers did not decrease the level of interactions with their nestmates. On the contrary, they devoted more time to trophallaxis. These results are discussed in relation to ant life history traits.

**Keywords:** Formicidae; immune response; social interactions; trophallaxis; antibacterial peptides; encapsulation.

## 1. INTRODUCTION

Ants constitute one of the most important groups of animals worldwide. Their evolutionary success can be attributed largely to their eusocial behaviour. Eusociality is rare among insects and is most frequently observed in insect orders Hymenoptera and Isoptera. Such highly social insects as ants, bees, wasps and termites are able to perform complex activities in their daily lives through mutual cooperation carried out in the context of such tasks as foraging for food and nest material, nest defence or food storing (Bonabeau et al., 1997; Hölldobler and Wilson, 1990; Wilson, 1971). These abilities have allowed them to colonize different habitats and to create large populations. Nevertheless, social insect colonies are exposed to numerous pathogens and diseases, a problem which may menace an entire social group and which becomes more dangerous with growing colony size. Therefore, ants have developed several physiological and behavioural mechanisms to solve or at least to minimize that risk. An important innovation – found exclusively in ants - was the appearance of metapleural glands situated at the extreme posterior corners of the mesosoma. It is known that in some ant species these glands produce highly active antiseptic substances that provide protection against microorganisms for both body surface and the interior of their nests (do Nascimento et al., 1996; Hölldobler and Engel-Siegel, 1985 ("1984"); Maschwitz, 1974; Maschwitz et al., 1970). In *Camponotus* ants, these glands are partially or even completely atrophied (Brown, 1968; Hölldobler et Engel-Siegel, 1985 ("1984")). However, these ants do not remain unprotected since the secretions of other glands show microbicidal action, e.g. the formic acid from poison gland (Revis et Waller, 2004).

Besides these preventive defences, ants possess an elaborate immune system, shared with all insects and other arthropods. The cuticle itself constitutes an excellent barrier against parasite invasion (Schmid-Hempel and Ebert, 2003), but once it is crossed, the immune system is activated by a specific antigen recognition system able to detect different

components of microorganisms: lypopolysaccharides from the outer membrane of Gram-negative bacteria, peptidoglycan unique to Gram-positive cell walls, as well as  $\beta$ -1,3-glycans and  $\beta$ -1,3-mannans from fungal cell walls (Gillespie et al., 1997). The main immune responses of insects and other arthropods include opsonization, phagocytosis, melanization, encapsulation, coagulation and production of antibacterial peptides (Gillespie et al., 1997), a large range of defences that have been very efficient throughout millions of years of evolution of these organisms.

Sociality is based on a trade-off between costs and benefits. For example, trophallaxis - the exchange of food among colony members - may favour the transmission of pathogens in colonies of fire ants (Jouvenaz, 1986). Grooming behaviour can remove parasites from a nestmate, but it also may infect termite workers engaged in grooming (Kramm et al., 1982). This seems valid in respect to both invertebrates and vertebrates: grooming represents an important way of nematode transmission among groups of mice (Heitman et al., 2003).

Immunity is costly in several ways. As shown by (Moret et Schmid-Hempel, 2000), bumblebee workers mounting an immune response to lypopolysaccharides or to microlatex beads survived for shorter time periods in conditions of starvation than control individuals. In *Apis mellifera*, the associative learning can be negatively affected by immune response (Mallon et al., 2003).

Research devoted to the impact of immune responses on insect social behaviour is still at its beginnings, especially in the case of ants. If we assume that both social relations and immune responses are costly, we will have to assume as well that each individual has to choose where to invest its energy. To throw more light on that question, we studied the relations between immune responses and social behaviour in the ant *Camponotus fellah*, a species known to engage in intense social interactions (Boulay et al., 1999). First, we examined the temporal dynamics of the antibacterial immune response induced by the

administration of peptidoglycans (PGN) from *Saccharomyces cerevisiae*. PGNs are the major component of the cell wall of Gram-positive organisms that confer to the cell wall great mechanical strength elicit immune reactions in the infected organisms (Stewarttull, 1980). For that purpose, we performed a test of bacterial inhibition and we measured the encapsulation response to estimate the immune responses arising as a consequence of the PGN treatment. Social costs associated with the immune response were estimated by observations of the behaviour displayed by workers subjected to PGN treatment. We hypothesized that these “infected workers” might change their behaviour as a consequence of a trade-off between immune responses and social behaviour, and, particularly, that they would show decreased level of social interactions.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **(a) *Ants***

The colonies of *C. fellah* were obtained by rearing newly mated queens collected in Tel Aviv (Israel) in March 2003. They were maintained in a temperature controlled room ( $28 \pm 2$  °C) under 12:12 h light-dark conditions. Colonies were installed in artificial plaster nests allowing direct observations of intranidal activities. Each nest was connected with a foraging area. The ants were fed with diet consisting of dead insects (mealworms, flies and moths) and sugar solution supplied twice a week. We used 10 colonies containing each one queen, at least 200 workers and abundant brood. We used as subjects media workers present in the foraging area.

### **(b) Immune treatments**

Peptidoglycans were extracted from *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, N°72789). The ants received one of the following three treatments: 'Naive' (N), 'Ringer' (R) and 'Peptidoglycan' (PGN). Workers in the naive group were chilled on ice prior to the experiment. Workers in the Ringer group received an injection of 0.5 µl of Ringer solution after being chilled on ice. Workers in the PGN group received 0.5 µl of a 0.5 mg/ml solution of PGN dissolved in Ringer solution. We injected the ants into the haemocoel through the pleural membrane between the second and the third tergite, using a sterilized fine glass capillary.

### **(c) Dynamics of antibacterial immune response**

We collected 0.5µl of haemolymph per individual from 32 naive workers to evaluate the normal conditions of workers from 10 studied colonies. The haemolymph of two workers was pooled in a 0.5 ml Eppendorf tube containing 1.0 µl of cold cacodylate/CaCl<sub>2</sub> buffer (0.01 M Na-Cac, 0.005 M CaCl<sub>2</sub>). We repeated this procedure for the injected workers (Ringer and PGN), determining antibacterial activity at 24, 48, 72, 96 and 120 hours post-injection. Antibacterial test plates (diameter 9cm) were prepared by adding 0.05 ml of live *Arthrobacter globiformis* bacteria suspension (10e7 cells/ml) to 7 ml of sterile broth medium (10 g bacto-tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 1,000 ml of distilled water, pH 7.5), with 1% of bacto-agar at 45°C. Twelve holes per plate were made in the agar, and 2 µl of the haemolymph solution extracted from the workers was added per hole for the test. The plates were then incubated at 28°C overnight. The antibacterial substances present in the haemolymph inhibit development of bacterial colonies on the plate, leading to a circular, clear

zone around each hole with a diameter proportional to the concentration of antibacterial substances. We measured the diameter of each zone of inhibition.

#### **(e) *Encapsulation rate assay***

To measure encapsulation rate, we inserted a 2 mm long piece of sterile nylon monofilament (0.12 mm diameter) in the pleural membrane between the second and third tergite. This procedure was carried out in the case of 36 workers immediately after the injection of PGN solution (n = 18) or Ringer solution (n = 18). Twenty four hours after, the implants were removed from the haemocoel and placed on a slide to be mounted into Clarion™ mounting medium. The removed monofilament was examined under a light microscope and photographed using a digital camera. The mean grey value of the whole implant was measured using the ImageJ 1.37v software. We assumed that the darkest grey received the highest encapsulation rate (total black). The background grey value was used to correct the values of the implants.

#### **(e) *Behavioural assays***

We performed 108 encounters of dyads of workers sampled in almost the same proportions from each of ten tested colonies. They were divided into 3 groups receiving the following treatments: (1) dyads consisting of 2 naive workers just chilled in ice (N/N); (2) one chilled worker and of another worker treated with PGN (N/Ip); (3) one naive and one injected with Ringer (N/Ir) (4) both ants treated with PGN (Ip/Ip) and (5) two workers injected with Ringer (Ir/Ir). Prior to the dyadic tests and just after the treatment, we isolated the workers for 24 or 48 hours in test tubes (18 x 180 mm) where they had *ad libitum* access to water and food. Bioassays consisted of dyadic encounters between individuals that were previously



subjected to the same isolation period. We placed two ants in the same test tube and started the observation 3-5 minutes after. Each test was continued during 30 minutes with observations taking place every minute according to the method of the scan sampling. For each encounter, we observed behaviours on 30 sample occasions, and noted the occurrence of three behaviour patterns (trophallaxis, self-grooming, and allogrooming). Frequency of each behaviour was quantified as the percentage of the 30 sample points.

#### **(f) *Statistical analyses***

We used a factorial ANOVA with two independent variables (time and type of treatment) to analyse the dynamics of antibacterial immune response. The dependent variable was the diameter of each inhibition zone. We compared the encapsulation rate, expressed by the grey mean value of nylons beads, between Ringer and PGN injected ants with Student's t-test. For behavioural essays, we normalized the data by arcsine transformation, compared the groups by ANOVA, and performed a Fisher LSD test for post-hoc comparisons when necessary.

### **3. RESULTS**

#### **(a) *Dynamics of antibacterial immune response***

The haemolymph of naive workers did not contain significant antibacterial activity (Figure 1). PGN and Ringer-treated workers displayed a similar antibacterial immune response during the period 1-4 days after injection ( $F_{(4, 155)} = 2.41$ ,  $p = 0.052$ , Fig. 1). No interaction between time and treatment was observed. The variation in antibacterial response was statically significant throughout time ( $F_{(4,155)} = 17.77$ ,  $p < 0.00001$ ), but no variation was detected between treatment and control ( $F_{(1,155)} = 1.99$ ,  $p = 0.16$ ). This implies that a simple trauma caused by the injection allowed mounting of an immune response. This activity was maintained for at least 96 hours and ceased after 120 hours.

### **(b) Encapsulation rate assay**

Ants subjected to injections of Ringer solution showed a significantly higher encapsulation rate than ants treated with PGN ( $P < 0.001$ , t test, Fig. 2).

### **(c) Social interactions**

Self-grooming and allogrooming were observed with low frequency (less than 10%) and did not show significant differences between the tested groups in either of two post injection periods used (ANOVA:  $P > 0.05$ ). Trophallaxis was observed more frequently. At 24 hours post injection, all treated workers (PGN or Ringer solution) devoted more time to trophallaxis than dyads consisting exclusively of naive workers, ( $F_{(4,80)} = 2.7288$ ,  $p = 0.04$ , Fig. 3a). In the ants tested 48 hours post injection, the level of trophallaxis increased in all groups, including naive workers. However we did not find significant differences among them ( $F_{(4,76)} = 2.32$ ,  $p = 0.07$ , Fig. 3b).

## **4. DISCUSSION**

The injection of either PGN or Ringer solution into *C. fellah* ants produced strong and closely similar antibacterial immune responses lasting four days after the trauma. The dynamics of the elicited antibacterial response show that the immune response had a shorter duration than that observed in bumblebees (Korner and Schmid-Hempel, 2004) and in *Tenebrio molitor* (Moret and Siva-Jothy, 2003) - whatever the type of challenge. Therefore, we can hypothesize that the antibacterial response in *Camponotus* ants restrains microbial infection and avoids another infection of the individual by maintaining a high level of antibacterial activity for at least 4 days.

Control injections using Ringer solution induced an immune response not discernible from the one caused by a PGN injection. Thanks to subsequent observations of naive workers we verified that haemolymph of normal, non-challenged ant workers does not contain

bactericidal peptides, or at least does not contain them at detectable levels. The question whether insects do respond to a bacterial infection by the coordinated synthesis of a specific array of antibacterial proteins remains open. We find conflicting results in the literature, with insects developing specific and adaptive humoral response to foreign substances (Karp et Rheins, 1980; Rheins et al., 1980) or unspecific response (Mohrig et Messner, 1968). In *Drosophila melanogaster*, it was demonstrated that septic injury activates two signalling pathways involved in humoral immune response: the Toll pathway that controls resistance to fungal and Gram-positive bacterial infections, and the Imd pathway that is responsible for defence against Gram-negative bacteria (Lemaitre et al., 1997), although these responses were lower than those provoked by the injury infected with Gram-negative and Gram-positive bacteria. The unpredictability of antibacterial immune response could be related to differential lifestyle of studied species. After unravelling of the complete genome sequence of honeybee (Honey Bee Genome Consortium., 2006), the authors verified that this social insect presents fewer proteins implicated in insect immune pathways when compared to other insect genomes, like that of *Drosophila*. The smaller diversity of immune-related proteins could be compensated by unspecific but efficient action of antibacterial peptides associated with other immune defence responses and the hygienic behaviour typical of social insects. Further studies devoted to insect immune responses will undoubtedly discover yet other evolutionary strategies of antibacterial defence.

Determination of encapsulation rates showed that PGN injections trigger a different immune response than Ringer solution injections. Interestingly, workers injected with PGN subsequently displayed a lower encapsulation rate than workers injected with Ringer. Studies of the interrelationship of cellular and humoral responses are scant but we may hypothesize that PGN injection depleted components of the encapsulation process (enzymes and cells).

In spite of mounting an immune reaction, *Camponotus fellah* workers did not decrease the level of their social interactions with their nestmates: self-grooming and allogrooming were maintained at the same levels in the control and treated groups, at both 24 and 48 hours after the injection. Interestingly, the presence of at least one worker previously subjected to an injection caused a significant intensification of trophallactic behaviour when tested 24 hours after the injection but not when tested 48 hours post injection. We cannot explain precisely the reasons for this effect but we should consider the effects of social isolation. As previously shown by others authors (Boulay et al., 2000; Cybulska et al., 2000), social isolation induces an increase of frequency and/or duration of trophallaxis in ants of the genus *Camponotus*. Forty-eight hours of isolation is a sufficiently long time to cause an increase in trophallaxis rate, even in naive ants.

In contrast to our hypothesis, costs associated with the immune challenges did not cause a significant decrease in energy allocated to social behaviour. On the contrary, the induction of an immune response was associated with increased trophallaxis. An increased level of trophallaxis could be interpreted as an alert signalling the infected status of a worker to other colony members. If this is the case, other workers could be able either to help the infected nestmate to overcome the infection, or to change their behaviour and to attempt to avoid the possible contamination of the entire colony. Our study supports the first of these two hypotheses.

We do not know precisely how trophallaxis may be involved in parasite transmission in ants, but we already know that viruses, nematodes and other parasites could be transmitted via trophallaxis in social insects (Schmid-Hempel, 1998). Considering this possibility, trophallactic behaviour should be inhibited in cases of infection. A search for the presence of antibacterial peptides in the trophallactic liquid of social insects might provide an interesting problem for future research. Studies conducted on *Drosophila* have shown that antibacterial

peptides can be induced on surface epithelium (Tzou et al., 2000). For example, the tissue of adult's salivary glands synthesizes an important amount of drosomycin. It will be interesting to analyse the composition of trophallactic fluid to know its possible role in disease prevention in ant colonies.

Our work showed that infection did not induce an immediate reduction of social interactions of workers. On the contrary, trophallactic behaviour was significantly increased. No avoidance behaviour of infected workers was verified so far. It remains thus an open question whether in ants social interactions and physiological mechanisms do indeed operate mutually to minimize the effects of infections on individual worker.

## **5. ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Ewa J. Godzinska for comments and English revision of the manuscript and Abraham Hefetz for collection of the mated queen ants. The work was supported financially by grants from the Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil) and the CNRS GDR Ecologie Comportementale 2155. We also thank all people of the “Genome and parasitic strategies” group for access to their laboratory.

## Figures

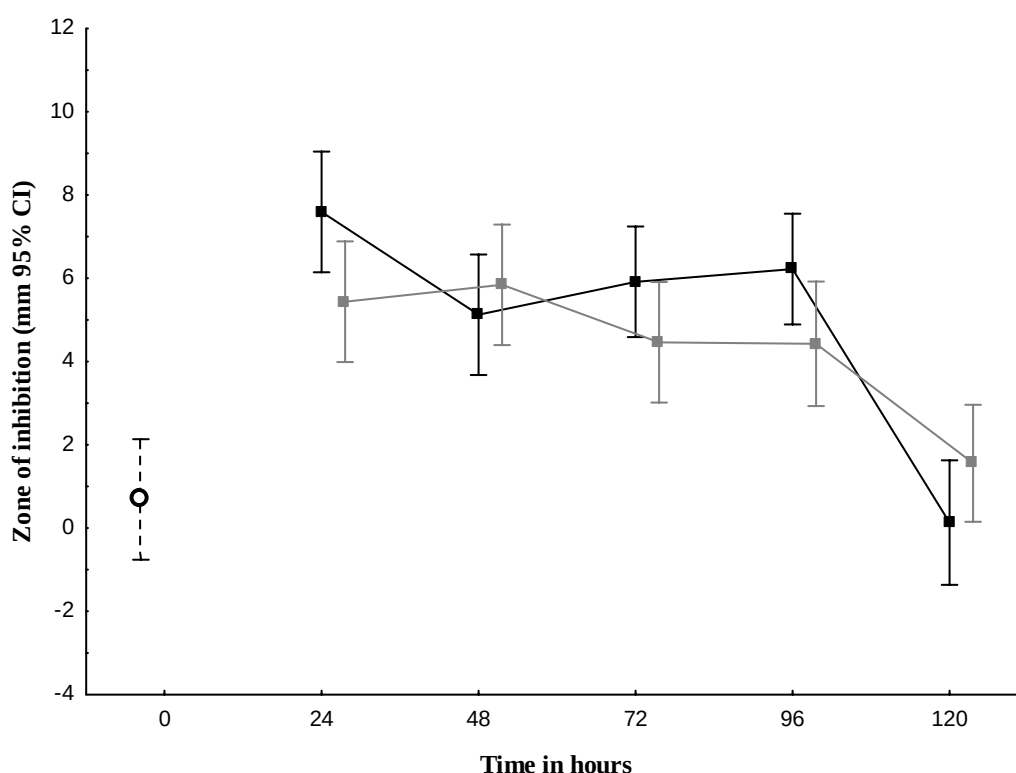


Figure 1. Temporal dynamics of antibacterial activity after an injection of sterile Ringer solution only (in grey) and an injection of PGN solution (0.5 mg/ml in Ringer Solution) (in black). Each dot is the mean of 14-16 measured pairs of individuals taken from 10 colonies of *Camponotus fellah*. The two lines are not significantly different by Factorial ANOVA,  $p > 0.05$ , for the interaction Time/Treatment. The circle in the time 0 represents the baseline obtained from naive workers (n=16).

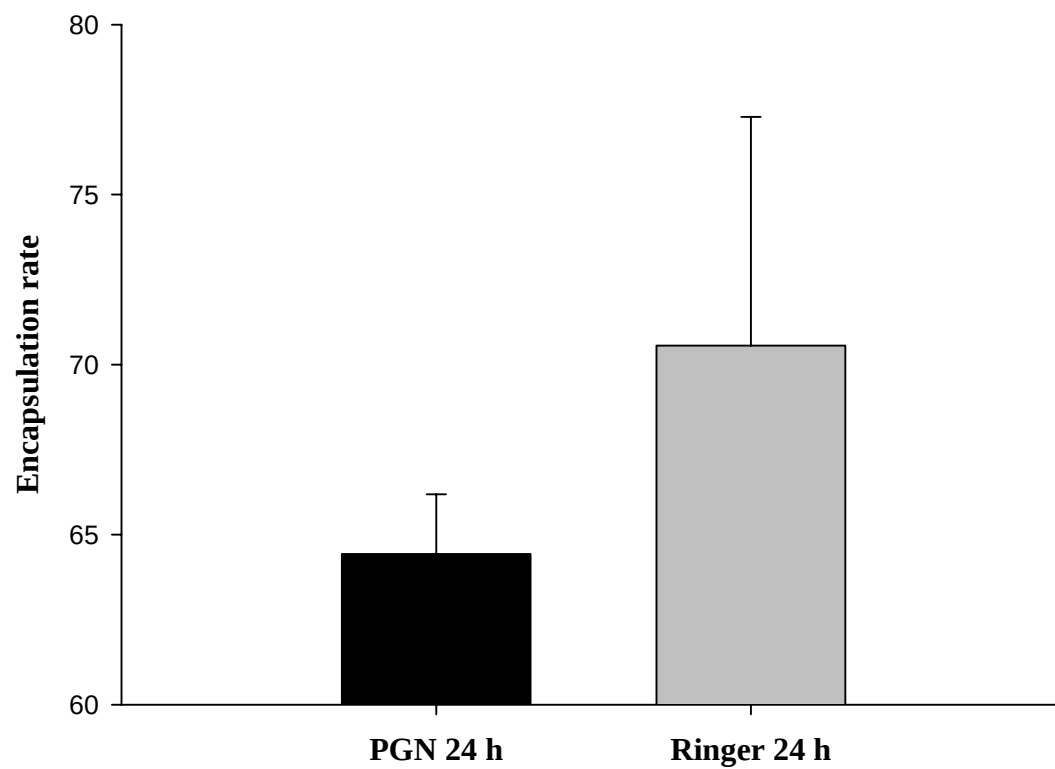


Figure 2. Mean encapsulation rate (artificial units  $\pm$  SD) of media workers injected with peptidoglycans (PGN) or Ringer, after 24 hours. Sample size values are N=18, for the two bars. Means are significantly different (t-test,  $p < 0.001$ ).

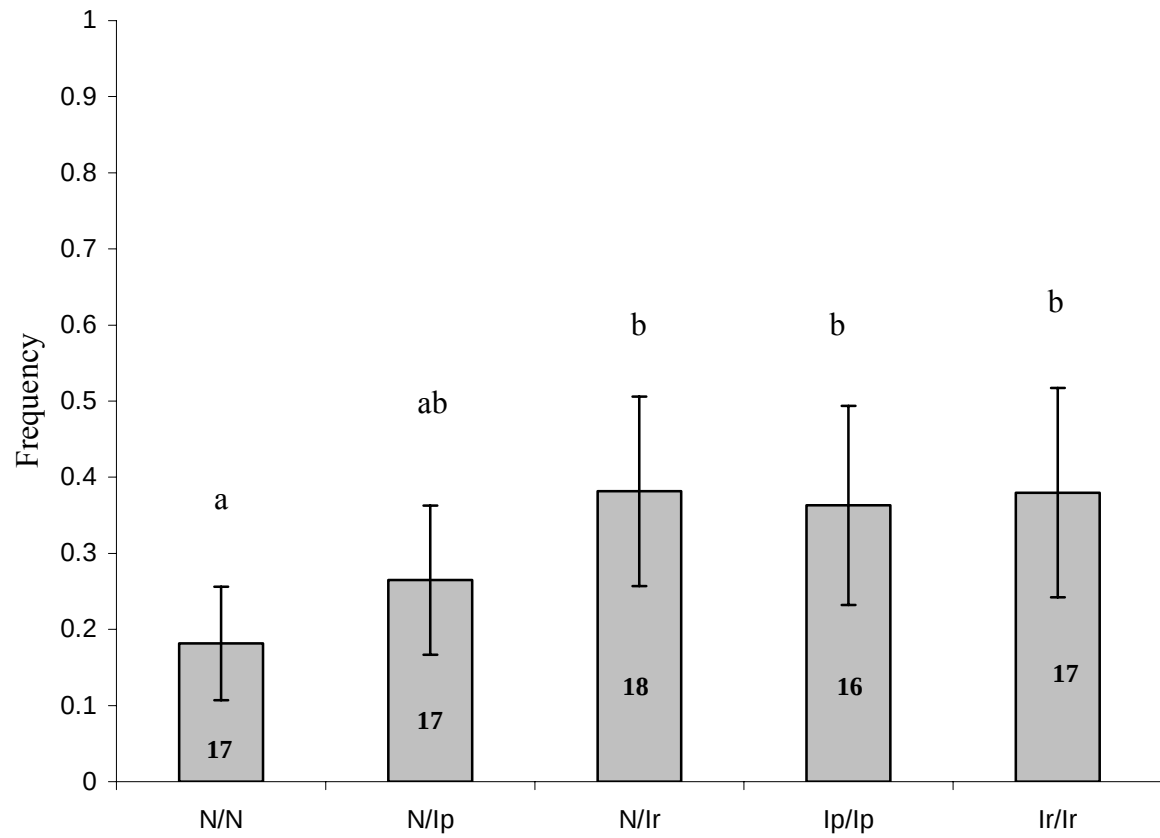


Figure 3a. Mean frequency ( $\pm$  SD) of trophallaxis between naive workers (N), workers injected with peptidoglycan (Ip), and workers injected with Ringer solution (Ir) observed during dyadic encounters after 24 hours of isolation. Numbers shown within the bars indicate sample size (number of dyadic encounters). Different letters denote significant differences (Fisher's LSD,  $p < 0.05$ ).



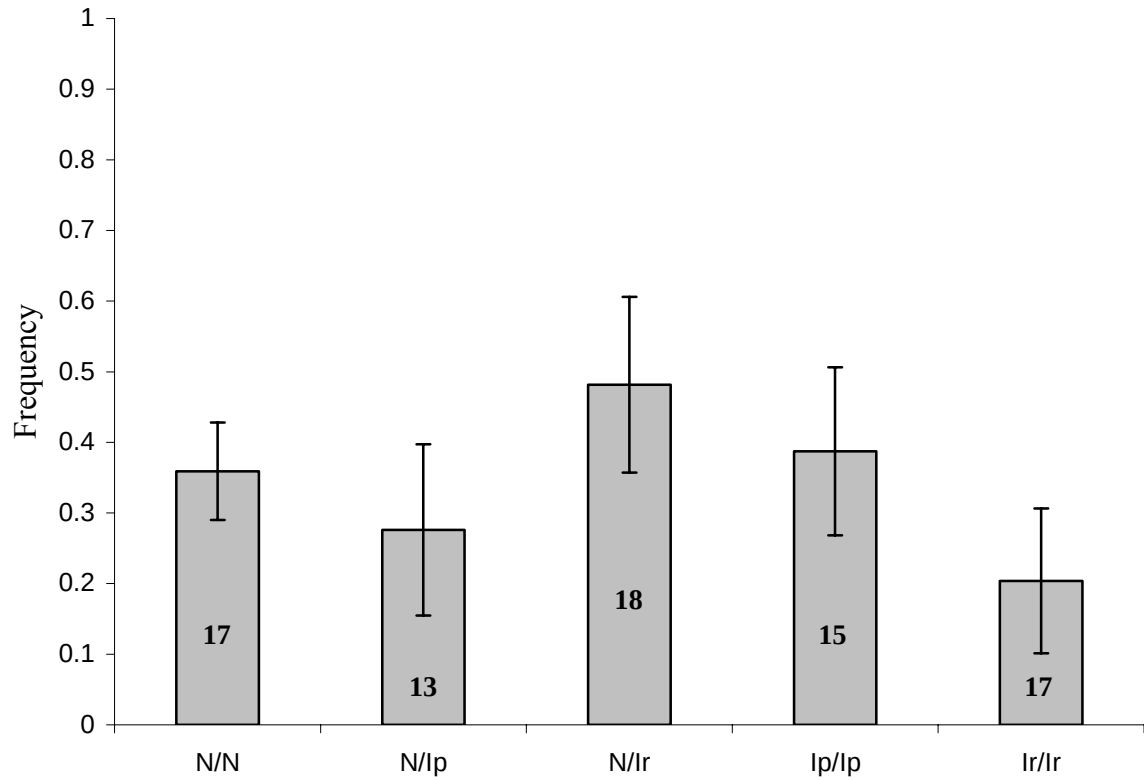


Figure 3b. Mean frequency ( $\pm$  SD) of trophallaxis between naive workers (N), workers injected with peptidoglycan (Ip), and workers injected with Ringer solution (Ir) observed during dyadic encounters after 48 hours of isolation. Numbers shown within the bars indicate sample size (number of dyadic encounters). The mean frequencies are not significantly different (ANOVA,  $F_{(4,76)}=2.32$ ,  $p=0.07$ ).

## REFERENCES

- Bonabeau, E., Theraulaz, G., Deneubourg, J.L., Aron, S., Camazine, S., 1997. Self-organization in social insects. *Trends Ecology and Evolution* 12, 188-193.
- Boulay, R., Quagebeur, M., Godzinska, E.J., Lenoir, A., 1999. Social isolation in ants: Evidence of its impact on survivorship and behavior in *Camponotus fellah* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology* 33, 111-124.
- Boulay, R., Hefetz, A., Soroker, V., Lenoir, A., 2000. *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbon exchanges. *Animal Behaviour* 59, 1127-1133.
- Brown, W.L., 1968. An hypothesis concerning the function of the metapleural glands in ants. *American Naturalist* 102, 188-191.
- Cybulska, A., Godzinska E.J., Wagner-Ziemka, A., 2000. Behaviour of dyads of ants reunited after social deprivation. *Biological Bulletin of Poznan* 37, 119-127.
- do Nascimento, R.R., Schoeters, E., Morgan, E.D., Billen, J., Stradling, D.J., 1996. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Chemical Ecology* 22, 987-1000.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42, 611-643.
- Heitman, T.L., Koski, K.G., Scott, M.E., 2003. Energy deficiency alters behaviours involved in transmission of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda) in mice. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 81, 1767-1773.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. The ants. Harvard University Press, Cambridge, Mass., xii + 732 pp.
- Hölldobler, B., Engel-Siegel, H., 1985 ("1984"). On the metapleural gland of ants. *Psyche* 91, 201-224.
- Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949.
- Jouvenaz, D.P., 1986. Diseases of fire ants: Problems and opportunities. In: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (Eds.), *Fire ants and leaf cutting ants, Biology and management*. Westview Press, Boulder, CO, pp. 327-338.
- Karp, R.D., Rheins, L.A., 1980. Induction of specific humoral immunity to soluble-proteins in the American cockroach (*Periplaneta americana*) .2. Nature of the secondary response. *Developmental and Comparative Immunology* 4, 629-639.

- Korner, P., Schmid-Hempel, P., 2004. In vivo dynamics of an immune response in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Journal of Invertebrate Pathology* 87, 59-66.
- Kramm, K.R., West, D.F., Rockenbach, P.G., 1982. Termite pathogens - transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. *Journal of Invertebrate Pathology* 40, 1-6.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1997. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14614-14619.
- Mallon, E.B., Brockmann, A., Schmid-Hempel, P., 2003. Immune response inhibits associative learning in insects. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 2471-2473.
- Maschwitz, U., 1974. Vergleichende Untersuchungen zur Funktion der Ameisenmetathorakaldrüse *Oecologia* 16, 303-310
- Maschwitz, U., Koob, K., Schildknecht, H., 1970. Ein Beitrag zur Funktion der Metathoracaldrüse der Ameisen. *Journal of Insect Physiology* 16, 387-404.
- Mohrig, W., Messner, B., 1968. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. *Biologisches Zentralblatt* 87, 439-470.
- Moret, Y., Schmid-Hempel, P., 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290, 1166-1168.
- Moret, Y., Siva-Jothy, M.T., 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 2475-2480.
- Revis, H.C., Waller, D.A., 2004. Bactericidal and fungicidal activity of ant chemicals on feather parasites: An evaluation of anting behavior as a method of self-medication in songbirds. *Auk* 121, 1262-1268.
- Rheins, L.A., Karp, R.D., Butz, A., 1980. Induction of specific humoral immunity to soluble-proteins in the American cockroach (*Periplaneta americana*) .1. Nature of the Primary Response. *Developmental and Comparative Immunology* 4, 447-458.
- Schmid-Hempel, P., 1998. *Parasites in social insectes*. Princeton University Press, Princeton, 409 pp.
- Schmid-Hempel, P., Ebert, D., 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 27-32.

- Stewarttull, D.E.S., 1980. The immunological activities of bacterial peptidoglycans. Annual Review of Microbiology 34, 311-340.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. Immunity 13, 737-748.
- Wilson, E.O., 1971. The insect societies. Harvard University Press, Cambridge, Mass., x + 548 pp.

## Deuxième partie

### L'endosymbiote primaire *Blochmannia* : quelles conséquences pour la fourmi *Camponotus fellah* ?

Article 2 : soumis à International Journal of Systematic and  
Evolutionary Microbiology, le 5 mars 2008 (n° IJS/2008/1818)

Article 3 : en préparation pour PLOS One

Article 4 : en préparation

## 1 - Problématique

Les bactéries *Blochmannia* peuvent fournir des aminoacides essentiels à leur hôte, les fourmis du genre *Camponotus*. Mais, le fait que beaucoup d'espèces de ce genre ont une diète omnivore nous fait poser l'hypothèse que la bactérie peut avoir d'autres rôles. Dans cette deuxième partie de la thèse, nous avons testé trois hypothèses concernant l'importance de la bactérie pour la fourmi :

- 1 – La bactérie est importante pour le développement des colonies dans les premiers stades de la colonie ;
- 2 – Elle favorise la réponse immunitaire de son hôte ;
- 3 – Elle a une participation à la formation de l'odeur coloniale.

## 2 – Modèle biologique et méthodes employées

D'abord, nous avons dû identifier l'endosymbiote de *Camponotus fellah*. Pour cela, nous avons isolé et séquencé une région du gène 16S rRNA d'environ 1500 pb. La bactérie étant localisée dans l'intestin moyen des ouvrières et dans les ovocytes de la reine, nous avons disséqué ces deux types d'organes. Ensuite, nous nous sommes intéressés à évaluer le développement des nouvelles colonies de *C. fellah* (à partir de reines juste fécondées collectées sur le terrain). Pour évaluer les effets des endosymbiotes, nous avons administré un antibiotique (rifampicine) aux nouvelles colonies, et vérifié l'efficacité du traitement par PCR quantitative et FISH.

Menant nos études sur de nouvelles colonies, nous avons envisagé d'établir la relation entre la quantité de bactéries portées par chaque ouvrière et leur réponse immunitaire. Finalement, nous avons testé les effets de la quantité de bactéries sur le profil d'hydrocarbures cuticulaires.

### 3 – Principaux résultats en cours de publication

#### 3a – Identification de la bactérie

D'abord, on a pu confirmer l'existence d'une nouvelle espèce de bactérie du genre *Blochmannia* chez *Camponotus fellah* (Article 2, voir aussi Fig. 7 ci-dessous). Leur position dans l'arbre phylogénétique des *Blochmannia* n'est pas bien définie, car il s'agit de l'unique espèce décrite hors des Amériques et de l'Europe (Art.2, Fig. 1, p. 77).

Nous avons par ailleurs vérifié qu'il était possible d'éliminer les bactéries par un traitement antibiotique, la rifampicine, utilisée dans d'autres laboratoires (voir Art. 3 , Fig. 1 et 2).

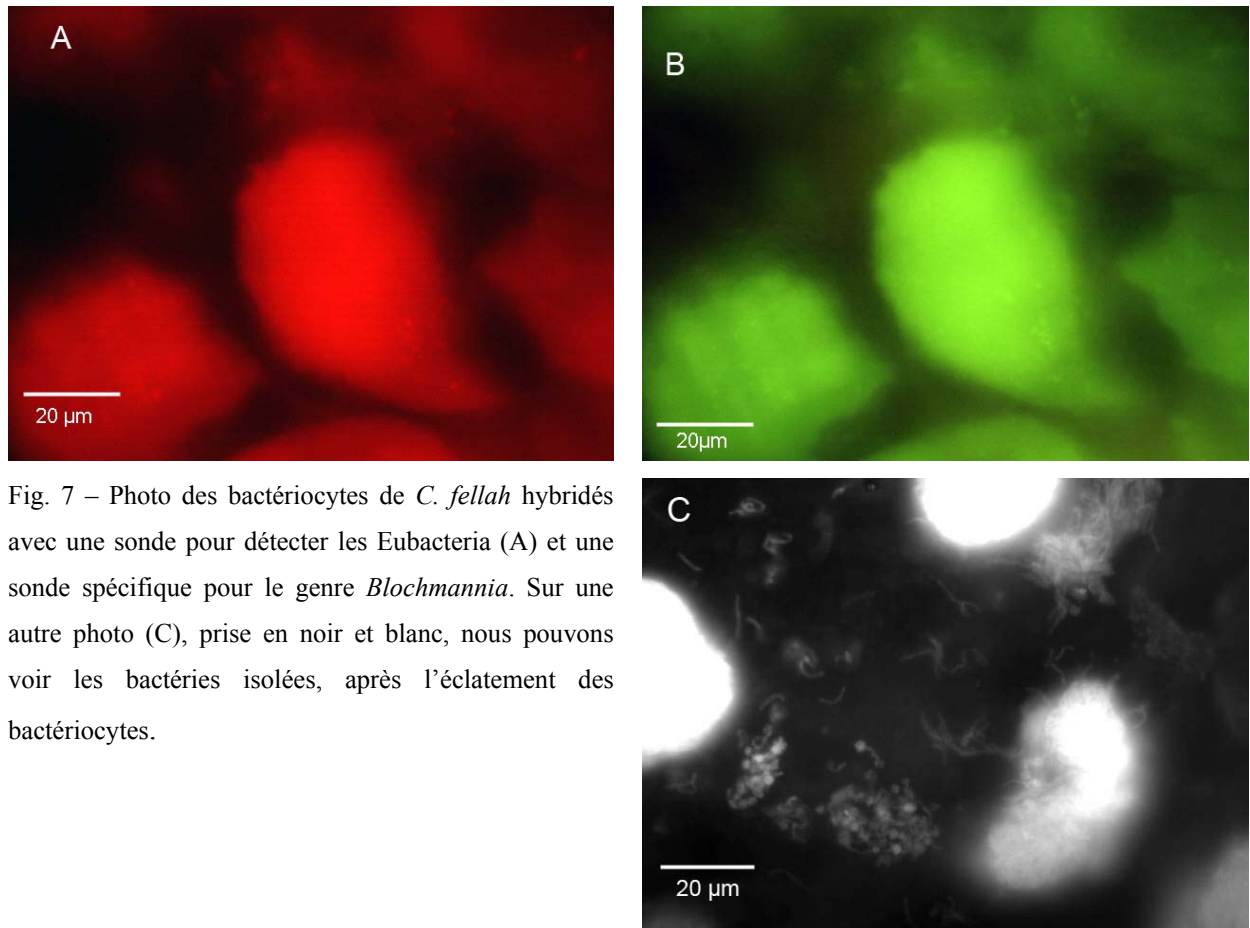


Fig. 7 – Photo des bactériocytes de *C. fellah* hybridés avec une sonde pour détecter les Eubacteria (A) et une sonde spécifique pour le genre *Blochmannia*. Sur une autre photo (C), prise en noir et blanc, nous pouvons voir les bactéries isolées, après l'éclatement des bactériocytes.

### 3b- Développement des jeunes colonies

Le développement des colonies est favorisé par la présence des bactéries puisque leur élimination a entraîné la diminution de production de larves, de nymphes et par conséquence des ouvrières adultes (Art. 3, Fig. 3a,b,c, 86-87 pp). Cela a une importance cruciale au moment de la fondation et de l'établissement des nouvelles colonies. Lors de l'essaimage, de très nombreuses reines sont produites, certaines d'entre elles arrivent à s'installer et fonder une nouvelle colonie. Au fil du temps, nombre d'entre elles disparaîtront par l'attaque de prédateurs et pathogènes, l'inanition ou la compétition avec d'autres colonies (Hölldobler et Wilson, 1990). Les reines fondatrices devront faire face à deux type de compétitions au moment de s'établir : avec les autres fondatrices et avec les colonies déjà établies (Jerome et al., 1998). Dans ce contexte, avoir plus d'ouvrières offre des avantages exceptionnels aux colonies : pour les colonies établies, cela peut leur assurer la dominance de l'espace et des ressources ; pour les jeunes colonies, cela facilitera l'occupation et l'exploitation de l'habitat. Une stratégie pour mieux exploiter une source de nourriture, trouvée chez *Camponotus*, est la formation de nids satellites (Debout et al., 2007). Dans ce cas, on dit que les colonies sont polydomiques, elles sont organisées en au moins deux nids séparés. Ceci illustre l'importance d'avoir plus d'ouvrières dans un scénario de forte compétition.



### 3c- *Blochmannia* et la réponse immunitaire chez *Camponotus fellah*

Concernant un autre trait de vie important pour les fourmis, la défense immunitaire, nous avons trouvé que la quantité de bactéries portée par chaque ouvrière est positivement corrélée au taux d'encapsulation d'un corps étranger, le fil de nylon (Art. 3 – Fig 4, p. 88). Ce type de défense semble particulièrement important car plusieurs espèces de mouches parasitoïdes (Diptera : Phoridae) sont associées aux nids de *Camponotus* (Disney, 1981; Disney et Maschwitz, 2000; Disney et Brown, 2003; Gadau et Disney, 1996). Le fait que le traitement antibiotique ait augmenté le taux d'encapsulation suggère une réponse au stress. Reste à savoir si cette réponse est liée à l'antibiotique utilisé ou s'il s'agit d'une réponse à l'absence de bactéries. Dans une étude conduite chez *Camponotus vicinus*, les auteurs ont constaté que l'administration d'un mélange de propiconazole et de tétracycline rendait les ouvrières plus susceptibles à l'attaque du parasitoïde *Apocephalus horridus* (Mankowski et Morrell, 2003). L'élimination des bactéries pourrait expliquer ce comportement, bien que les auteurs n'aient pas discuté cet aspect.

### 3d- *Blochmannia* et les hydrocarbures cuticulaires (Art. 4)

Nous avons constaté une augmentation de la quantité totale d'hydrocarbures cuticulaires suite au traitement avec l'antibiotique (Art. 4, Fig. 2, p. 109). Par contre, il n'y a pas eu de modifications du profil des hydrocarbures. Le pourcentage de chaque substance restait comparable entre les fourmis traitées et les contrôles. Nous suggérons que la symbiose fourmis / bactéries fait l'objet d'un trade-off dans certains traits d'histoire de vie de ces fourmis. L'augmentation de la quantité d'hydrocarbures doit faciliter la lutte contre la dessiccation, mais aussi augmenter la protection contre l'invasion de pathogènes et parasites divers d'autant plus dangereux que le système immunitaire est affaibli par la disparition des bactéries.

#### 4 - Encapsulation et mélanisation cuticulaire

Nous avons prélevé un morceau du troisième tergite de chaque ouvrière qui avait été testée pour la réponse d'encapsulation. Il a été fixé sur une lame, photographié et analysé de la même façon que les filaments de nylons (Art. 3). La valeur moyenne de gris de chaque figure (la moyenne de trois plots par figure, sur des points non flous ; la valeur de fond a été déduite à chaque fois, Exemple Fig. 8) nous indiquait le degré de mélanisation cuticulaire de chaque ouvrière.

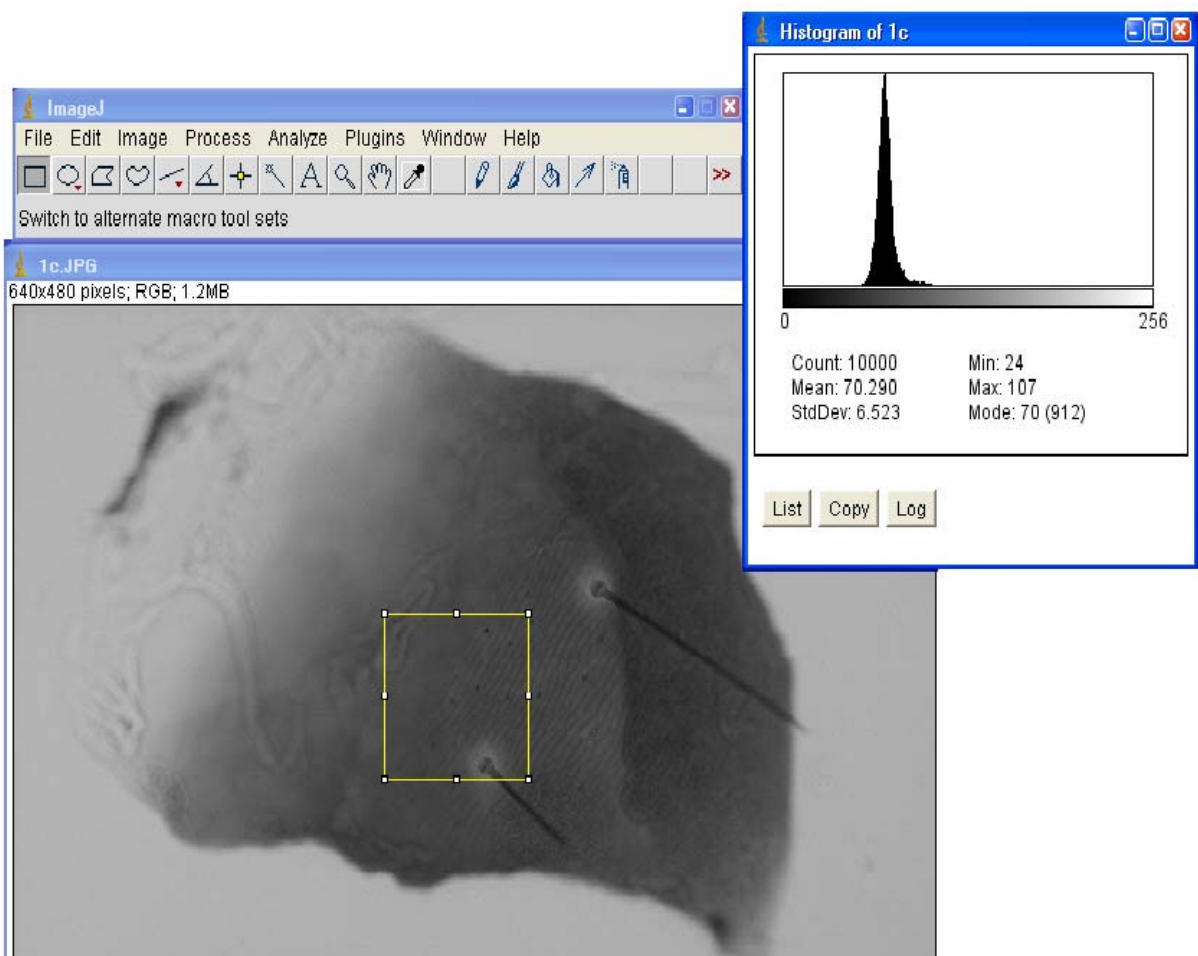


Figure 8 – Exemple d’une fenêtre du logiciel ImageJ et la photo d’un morceau du tergite. A côté, au dessus, nous avons une petite fenêtre avec la valeur moyenne de gris, pour le plot carré. Ces mesures ont été transformées pour nous donner une valeur artificielle de référence du degré de mélanisation.

Cela nous a permis vérifier que :

- Il existe une corrélation entre le degré de mélanisation cuticulaire et le taux d'encapsulation chez les fourmis non traitées, ce que n'est pas observé chez les fourmis traitées (Fig 9). La variation de mélanisation chez les fourmis non traitées est faible, ce qui indique l'homogénéité de ce groupe de fourmi.
- L'antibiotique a fait augmenter la mélanisation cuticulaire. Donc, les fourmis traitées présentent non seulement un plus fort taux d'encapsulation mais aussi un plus fort degré de mélanisation. Une ANCOVA prenant le taux d'encapsulation et le degré de mélanisation comme variables indépendantes, la quantité de bactérie comme prédicteur continu donne un résultat très significatif ( $F(2,52)=170.40$ ,  $p<0,00001$ ).
- Nous n'avons pas pu établir une corrélation entre le degré de mélanisation et la quantité d'hydrocarbures cuticulaires. Mais cette augmentation du degré de mélanisation est en accord avec les résultats de l'article 4, c'est-à-dire une augmentation de la production des hydrocarbures cuticulaires.

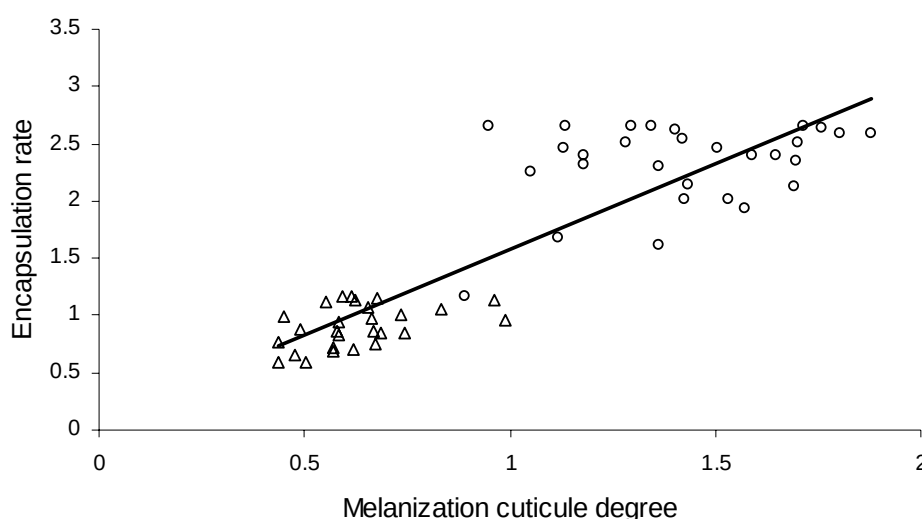


Figure 9 – Corrélation entre le degré de mélanisation cuticulaire des ouvrières de *Camponotus fellah* et le taux d'encapsulation d'une particule étrangère (filament de nylon). Les valeurs sont des unités artificielles transformées en logarithme. Δ représente les ouvrières issues de colonies non traitées (n=27) et O les ouvrières traitées avec l'antibiotique rifampicine (n=29). Nous n'observons pas de corrélation significative chez les fourmis traitées ( $r=0.32$ ,  $p=0,1$ ). Par contre, il existe une faible, mais significative, corrélation positive chez les

fourmis contrôles ( $r=0.44$ ,  $p=0.02$ ). Globalement, nous observons une forte corrélation entre le degré de mélanisation et l'encapsulation ( $r=0.88$ ,  $p<0,00001$ ).

## 5 - Phylogénie de *Camponotus fellah* et son endosymbiote *Blochmannia* (En collaboration avec Delphine Depoix)

Nous avons séquencé le gène mitochondrial de la fourmi pour la cytochrome oxydase, sous unité I (COI). Les primers furent construits selon l'alignement des séquences disponibles sur GenBank (COIFor 5' –CATCCTGAAGTATATATTCTA- 3' et COIRev 5' –AAGATGATGTCAATGGAAGAGTTT- 3'). Pour la construction de l'arbre, nous avons pris les séquences pour la cytochrome oxydase I des mêmes espèces de *Camponotus* utilisées pour construire l'arbre des symbiotes (Art. 2). L'espèce *Messor* cf. *structor* a été utilisée comme groupe externe (numéros d'accès des séquences sur GenBank, table 1). Nous avons aligné tous les séquences et analysé les fragments de 383 pb, taille correspondant à celle de la COI de *C. fellah*.

Les phylogénies de l'hôte et des endosymbiotes ne montrent pas une parfaite concordance, mais on observe le groupement identique de presque toutes les espèces. La position de la fourmi *C. fellah* reste indéfinie, comme l'était son endosymbiote, probablement parce qu'il s'agit de l'unique espèce venue du Sud-Ouest Asiatique. La plupart des espèces étudiées jusqu'à présent sont issues des Amériques (surtout des Etats-Unis) et seulement quelques unes d'Europe. Quand il s'agit des fourmis, les espèces semblent former des groupes en accord avec leurs sous-genres (Fig. 10a), au contraire de endosymbiotes (Fig. 10b).

Table 1 - Espèces de fourmis, leur localisation géographique et les numéros d'accès des séquences COI sur GenBank. Séquence de COI de *C. fellah* déposée sur Gen Bank le 04 mars 2007 (Souza et al.,)

| Espèces (sous-genre)                          | Origine géographique    | Numéro d'accès COI |
|-----------------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) balzani</i>       | Madre de Dios, Pérou    | AF187955           |
| <i>Camponotus (Myrmothrix) floridanus</i>     | Ft Pierce, Florida, USA | AF186362           |
| <i>Camponotus (Camponotus) herculeanus</i>    | Idaho, USA              | AF176687           |
| <i>Camponotus (Camponotus) herculeanus</i>    | Bavaria, Allemagne      | AY280591           |
| <i>Camponotus (Camponotus) pennsylvanicus</i> | USA                     | AF186360           |
| <i>Camponotus (Myrmepomis) sericeiventris</i> | Missiones, Argentine    | AF187959           |
| <i>Camponotus (Camponotus) ligniperdus</i>    | Leinach, Allemagne      | AF176686           |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) silvicola</i>     | Cuzco Amazonico, Pérou  | AF187954           |
| <i>Camponotus (Myrmothrix) rufipes</i>        | Rio, Brésil             | AF187957           |
| <i>Camponotus (Myrmentoma) sayi</i>           | Portal, AZ, USA         | AY334385           |
| <i>Camponotus (Camponotus) schaefferi</i>     | Portal, AZ, USA         | AY334388           |
| <i>Camponotus (Camponotus) laevigatus</i>     | Portal, AZ, USA         | AF398162           |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) castaneus</i>     | Bayhead, Florida, USA   | AF187960           |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) vafer</i>         | Portal, AZ, USA         | AY334383           |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) festinatus</i>    | Portal, AZ, USA         | AY334386           |
| <b><i>Camponotus (Tanaemyrmex) fellah</i></b> | <b>Tel-Aviv, Israël</b> | <b>EF422834</b>    |
| <i>Messor cf. structor</i>                    | Retz, Autriche          | DQ074354           |

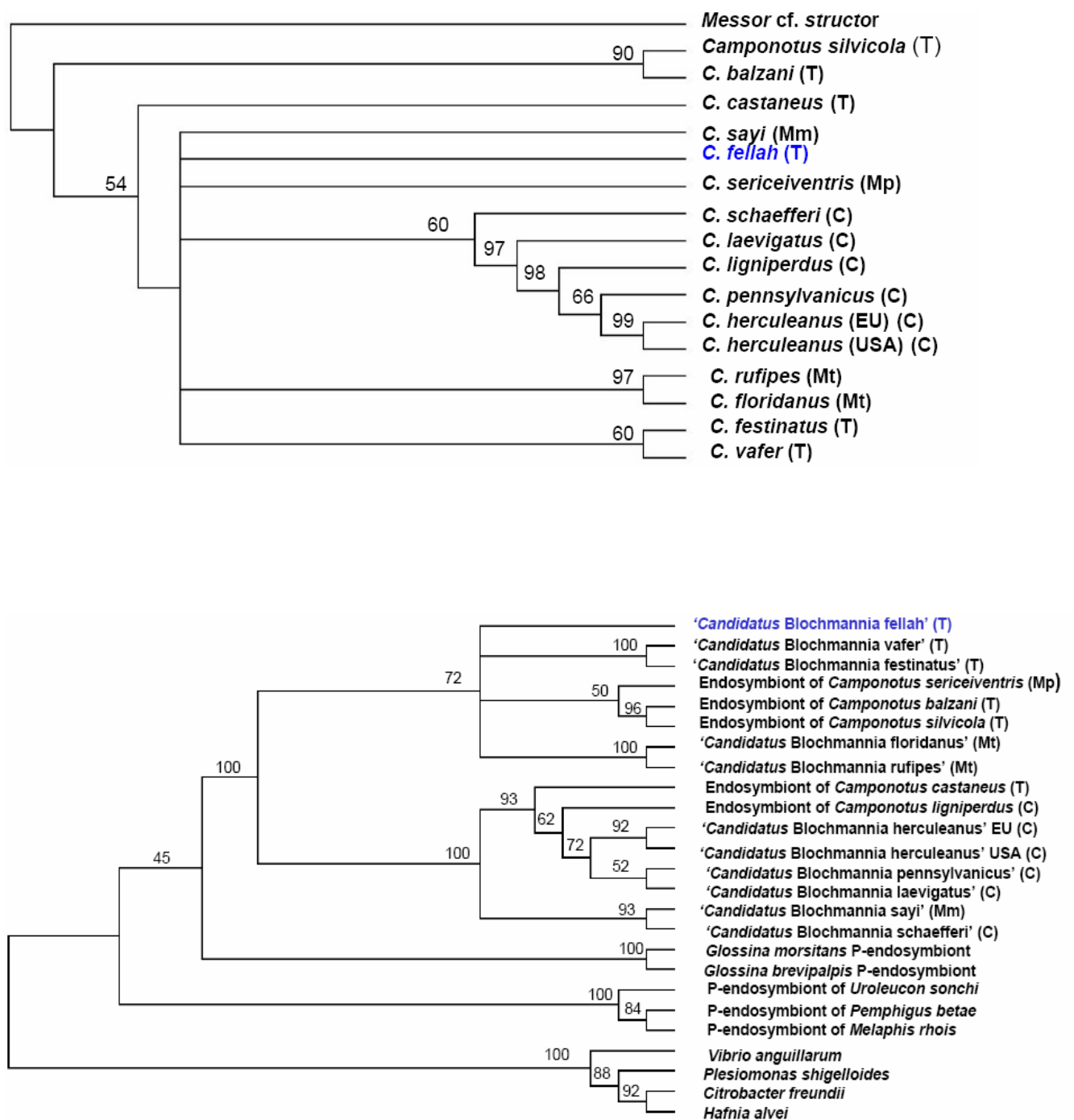


Fig. 10 – Analyse phylogénétique de l'hôte (A) et des endosymbiotes (B). Les analyses ont été réalisés avec le logiciel PhyloWin, méthode de « Neighbor-Joining ». Distance « observed divergence » pour l'hôte (A) et Jukes et Cantor pour les endosymbiotes (B). L'arbre obtenu a été formaté avec l'aide du logiciel TreeView. Les chiffres sont les valeurs de bootstrap (1000 réplifications). Les sous-genres de *Camponotus* sont indiqués par C=*Camponotus*, T=*Tanaemyrmex*, Mm=*Myrmentoma*, Mt=*Myrmothrix* et Mp=*Myrmepomis*.

## 6 – Possibilité de transfert de gènes de la bactérie vers l'hôte

L'endosymbiote *Wolbachia pipientis*, remarquable dans le phylum animal, peut transférer vers l'hôte son génome entier ou des séquences plus courtes (Hotopp et al., 2007). Les genres de bactéries qui ont des segments d'ADN mobile sont strictement pathogéniques (*Coxiella*, *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Phytoplasma* et *Rickettsia*) ou parasites (*Wolbachia*). A ce jour, le transfert latéral de gènes bactériens vers l'hôte n'a pas été retrouvé chez les bactéries intracellulaires mutualistes obligatoires, comme *Blochmannia*, *Buchnera* et *Wigglesworthia* (Bordenstein et Reznikoff, 2005). Il s'agit d'espèces sans régions génétiques mobiles, espèces mutualistes nutritives d'insectes, transmises verticalement.

Ce fait indique que les différences dans le mode de transmission de ces bactéries pourraient moduler la plasticité de leur génome. Dans ces conditions, vis à vis de la grande diversité génétique des bactéries du genre *Blochmannia* qui sont à découvrir, nous avons vérifié si les séquences bactériennes détectées par PCR quantitative après le traitement par antibiotique ne seraient pas leur l'ADN intégré à celui de l'hôte.

Pour ça, nous avons extrait l'ADN de l'intestin moyen et des pattes de trois fourmis. La non détection du gène 16S rDNA (spécifique de la bactérie) sur l'ADN des jambes nous montre que l'ADN bactérien quantifié après traitement par antibiotique appartient aux bactéries survivantes, ou simplement aux fragments d'ADN non dégradés de bactéries mortes, et non à l'ADN intégré au génome de la fourmi. Le gène 18S rDNA de la fourmi nous a servi comme contrôle (Fig. 11).

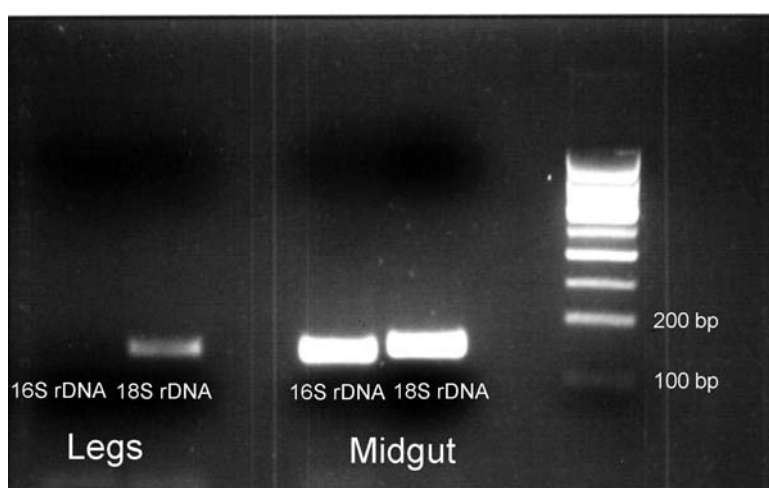


Fig. 11 – PCR avec les deux marqueurs moléculaires, sur l'ADN extrait des pattes et de l'intestin moyen des ouvrières de *Camponotus fellah*.



## 7 – Conclusions et perspectives de la partie III

- Notre travail montre que *Blochmannia* peut influencer d'autres aspects de la vie de leur hôte que la nutrition.
- Avoir plus de bactéries signifie avoir un développement de colonie accéléré. Cela permettra à la colonie de monopoliser les ressources d'une région (espace et alimentation) et lui permettra d'arriver plus vite au stade de production de sexués. Seule une infime partie des nouvelles colonies arriveront à ce stade, crucial pour le succès reproductif des deux espèces partenaires.
- La réponse immunitaire d'encapsulation est favorisée par une quantité plus grande de bactéries. Il s'agit aussi d'un trait essentiel pour la survie de la colonie, toujours exposée à un très grand nombre de parasites et parasitoïdes.
- L'élimination des bactéries par l'antibiotique rifampicine a causé trois réponses inattendues et qui semblent être liées : augmentation du taux d'encapsulation, du degré de mélanisation et de la production de hydrocarbures cuticulaires. Il nous reste à savoir si c'est une réponse au stress causée par l'élimination de la bactérie ou une réponse au stress due à l'administration de l'antibiotique en soi. Cet antibiotique est très utilisé dans différents modèles biologiques, visant à supprimer les endosymbiotes. Jusqu'ici aucun rapport d'effets délétères sur l'hôte n'a été mentionné. Pour mieux répondre à ces questions, il est nécessaire de réaliser d'autres études avec différents antibiotiques, et d'analyser leurs effets sur des espèces proches de *Camponotus*, de préférence non porteuses d'endosymbiotes primaires.
- Dans un scénario de forte compétition entre les colonies, on devra s'attendre à une sélection pour que les fourmis portent une quantité plus large de bactéries. Cette tendance pourrait être contrebalancée si les bactéries représentent un coût énergétique pour les fourmis. La grande diversité d'espèces, distribuées mondialement, fait le modèle *Camponotus/Blochmannia* très intéressant pour étudier comment l'hôte et l'endosymbiote s'adaptent aux variations de l'environnement. Par exemple, on pourrait s'attendre à trouver plus de bactéries chez les espèces de *Camponotus* confrontés à une compétition plus forte ou soumises à une attaque plus fréquente des parasitoïdes.
- Pour la reconstruction de la phylogénie des deux espèces, il faudrait avoir des échantillons plus représentatifs des espèces du monde entier et dans le cas de l'hôte

fourmi, avoir d'autres séquences génétiques que celles utilisées dans cette thèse. Il pourrait être intéressant d'identifier les symbiotes de *Camponotus* endémiques, comme l'espèce *C. aurosus* celle que l'on trouve à La Réunion. Il faudrait aussi séquencer la COII de *C. fellah* pourrait nous aider à mieux positionner cette espèce dans l'arbre phylogénétique des fourmis.

Article 2 : soumis à IJSEM le 5 mars 2008 (n° IJS/2008/1818)

*‘Candidatus Blochmannia fellah’* sp. nov., an endosymbiont of the ant  
*Camponotus fellah*

Danival José de Souza,<sup>1</sup> Delphine Depoix,<sup>1-2</sup> Alain Lenoir<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Université François Rabelais, Avenue Monge, Parc de Grandmont 37200, Tours, France

<sup>2</sup> Present address : Laboratoire de Biologie Fonctionnelle des Protozoaires, USM504-EA3335, Département Régulations, Développement, Diversité Moléculaire, Muséum National d’Histoire Naturelle, 61 rue Buffon, 75005 Paris, France

**Correspondence:** Danival José de Souza danivalbr@yahoo.com.br

Running title: *‘Candidatus Blochmannia fellah’* sp. nov.

## Summary

*Camponotus*, the carpenter ants, is one of the largest ant genus and it is found in most parts of the world. All ants in this genus, and also some related genera, harbor an obligate bacterial endosymbiont of 'Candidatus Blochmannia' genus. *Blochmannia* belong to the  $\gamma$ -subclass of the Proteobacteria and occurs exclusively within queen ovaries and within specialized host cells of the midgut. On the basis of 16S rRNA gene sequence similarity and on Fluorescent in situ hybridization, we found a new endosymbiotic species of *Camponotus fellah*, related to other bacteria species of the 'Candidatus Blochmannia' genus (~92 %). 'Candidatus Blochmannia fellah' is the first endosymbiotic bacterium identified from a *Camponotus* species of the subgenus *Tanaemyrmex* in Southwest Asia.

In 1882 Blochmann described a close association of “bacteria-like structures” with the tissues of the midgut and the ovaries of the ant species *Camponotus ligniperdus* (Blochmann, 1892). More than 100 years after, the bacterium was formally designated as *Candidatus Blochmannia* gen. nov. (*Blochmannia*) (Sauer *et al.*, 2000). These bacteria are Gram-negative rods of variable length, large numbers of which reside in the cytoplasm of bacteriocytes, specialized host cells that are intercalated between enterocytes of the ant midgut, without membrane structures surrounding them (Schröder *et al.*, 1996). The same bacteria are found in the cytoplasm of oocytes of queens, suggesting a vertical transmission route of the bacteria (Schröder *et al.*, 1996). These bacteria cannot yet be cultured independently of their host.

*Camponotus* is an ant genus of about 1000 species (Bolton, 1995) and all the ants investigated so far (~30) possess *Blochmannia* bacterial endosymbionts (Sameshima *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2002; Schröder *et al.*, 1996); it is thus supposed that the symbiotic relation is obligatory. Three related genus, *Polyrhachis*, *Colobopsis* and *Echinopla* have also *Blochmannia* symbionts (Feldhaar *et al.*, 2007; Wernegreen *et al.*, 2003). The close specific relation between the partners indicate a co-speciation between the ant and its bacteria (Degnan *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2000).

The sequence of *Blochmannia floridanus* and *B. pennsylvanicus* genomes revealed that these bacteria have a small genome (700~kb) (Degnan *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2003), and retain genes to biosynthesize amino acids and other nutrients essential for the host (Gaudermann *et al.*, 2006), corroborating that it play a major role in ant nutrition. However, other biological functions are not excluded since the host ants have a non-specialized diet and can normally live after bacteria suppression with an antibiotic (Feldhaar *et al.*, 2007). Here, we report a new endosymbiotic bacterium species found in the ant *Camponotus fellah* originating from the Southwest Asia. Up to now, all the described bacteria are originating from America or Europe; it is the first description of a ‘*Candidatus Blochmannia*’ genus species found in *Camponotus* ants from that region.

**Sequencing of the 16S rDNA gene.** Colonies of *Camponotus fellah* ant were collected in Tel-Aviv, Israel, and maintained in laboratory conditions. DNA was extracted from workers using a Dneasy Kit (Qiagen). The 16S rRNA gene was amplified using the previously described primers SL (TTGGGATCCAGAGTTTGATCATGGCTCAGAT) and SR (CACGAATTCTACCTTGTTACGACTTCACCCC) (Schröder *et al.*, 1996). The PCR reactions were made to a total volume of 25µl containing 2.5mM dNTPs, 7.5mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol each oligonucleotide and 2.5 U /µl *Taq* DNA polymerase (GoldStar®). Amplification

was performed in an Eppendorf thermocycler according to the following conditions: 30 s denaturation at 94°C, 30 s primers annealing at 55 °C and 1.5 min primer extension at 72°C, running 35 cycles. The amplified DNA fragment of approximately 1,550 bp was purified using a QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) and directly sequenced using the ABI PRISM™ dye terminator cycle. The sequencing reactions were performed using the SL and SR primers and using the two internal primers sequences CampL (5'-GAATTACTGGGCGTAAAGAGT-3') and CampR (5'-GGAACGTATTCACCG TGAC-3'). Additionally, two reverse primers were designed two reversal primers to complete the sequences: P1rev(5'-CTCTCAGACCAGCTAAGGAT-3') and P2rev(5'-ACCGCTACACCTGGAATTCT-3').

**Molecular phylogenetic analysis.** The 16S rDNA sequence of '*Candidatus* Blochmannia fellah' was submitted to BLAST analysis and related sequences of more than 1200 bp were chosen and aligned by the Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Phylogeny was reconstructed using Jukes and Cantor distances (Jukes et Cantor, 1969) and phylogenetic tree was constructed by neighbour-joining methods of PhyloWin software. One thousand bootstrap replicates were used to assess support for the individual nodes.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The 16S rDNA sequence of '*Candidatus* B. fellah' was deposited in the GenBank database under accession number EF422835. The accession numbers of endosymbionts sequences used for the phylogenetic analysis are given in the Table 1. Supplementary sequences of related bacteria were chosen according the previous work of Sauer *et al.* (2000). Their accession number is given in parenthesis:

(M59159) *Plesiomonas shigelloides*, (M59155) *Hafnia alvei*, (AJ233408) *Citrobacter freundii*, (X16895) *Vibrio anguillarum*, and insect endosymbionts (L37341) *Glossina brevipalpis*, (L37339) *Glossina morsitans*, (M63255) *Buchnera aphidicola* (primary endosymbiont of *Melaphis rhois*, (M63254) *Buchnera aphidicola* (primary endosymbiont of *Pemphigus betae*), (M63250) *Buchnera aphidicola* (primary endosymbiont of *Uroleucon sonchi*).

**Fluorescent *in situ* hybridization.** The oligonucleotides used for *in situ* hybridization were described previously. Bacteriocytes were visualized by FISH with oligonucleotide probes Eub338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (Amann *et al.*, 1990), targeting a conserved region of the eubacterial 16S rRNA, and with Bfl172 (5'-CCTATCTGGGTTCATCCAATGGCATAAGGC-3'), targeting a 16S rRNA region specific for *B. floridanus* (Schröder *et al.*, 1996). Probes were labelled with the fluorescent dyes Cy3 or FITC at the 5' end (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Germany). For protocol process details see (Feldhaar *et al.*, 2007a). The ovaries of three years old queen were dissected, fixed and hybridized like the midguts. The slides were analyzed with a Leica DMR microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and pictures were taken with a RT Slider digital camera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA).

According to the Ribosomal Database Project (Wang *et al.*, 2007), the 16S rDNA sequence of *Camponotus fellah* endosymbiont correspond to an unclassified  $\gamma$ -Proteobacteria closely related to 26 16rDNA sequences from *Blochmannia* endosymbionts bacteria of various *Camponotus* ant species. This sequence has G+C content of 47 mol% which is near of that of other *Blochmannia* symbionts.

When compared with the sequences of others *Blochmannia*, maximum identity ranged from 91-93 %. However, other *Blochmannia* species present in the GenBank exhibit until 98% of identity to each other. Phylogenetic comparisons showed the existence of a monophyletic group containing classified and unclassified endosymbionts from *Camponotus* ant species, closer of others insect endosymbionts and distinct from other outgroup bacteria (Fig. 1). '*Candidatus Blochmannia fellah*' clustered with other *Blochmannia* species but its position is not well established. Probably because most of described species are from America and only two from Germany. It is the unique studied species from the Southern-Asia. As it has been found in a previous study, the host subgenera are not forming monophyletic groups, especially the *Tanaemyrmex* subgenus, the subgenus of *Camponotus fellah*. (Degnan *et al.*, 2004).

The use of primers specific for Eubacteria and *Blochmannia* endosymbionts showed the bacteriocytes of midgut preparations full of bacteria (Fig. 2). In these preparations it is possible to see the individual bacterium and its rod form. The bacteriocytes were also detected in the oocytes as well.



### Description of ‘*Candidatus Blochmannia fellah*’

The symbiont of *Camponotus* ants was previously designated ‘*Candidatus Blochmannia*’ genus (Bloch.man’ni.a’ N.L. fem.n. ) referring to F. Blochmann, the first to describe this bacteria (Sauer *et al.*, 2000). The "*Candidatus*" concept is used since these bacteria are characterized as yet uncultured organisms. They are Gram-negative rod shaped bacteria of variable length (10-20 µm). See Sauer *et al.* 2000 for more details of the original genus description. The new species described has all the typical characteristics of *Blochmannia* bacteria and its 16S rDNA sequence (EF422835 GenBank accession number) is unique, indicating a new species. ‘*Candidatus Blochmannia fellah*’ (fel’lah’ N.L. mascu. n.) for the novel bacterium. The specific name is derived from its ant host species, *Camponotus fellah*. Fellah is a word derived from Arabic and signifies a peasant, farmer or agricultural laborer in the Middle East.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Abraham Hefetz from Tel-Aviv University for collection of the mated queen ants. Sascha Stoll from Wurzburg University aided us on FISH techniques and taking the photos presented here. We thank Jérôme Lesobre and all people from the IRBI group “Génome et Stratégies Parasitaires”. The first author was supported financially by grants from the Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil).

### REFERENCES

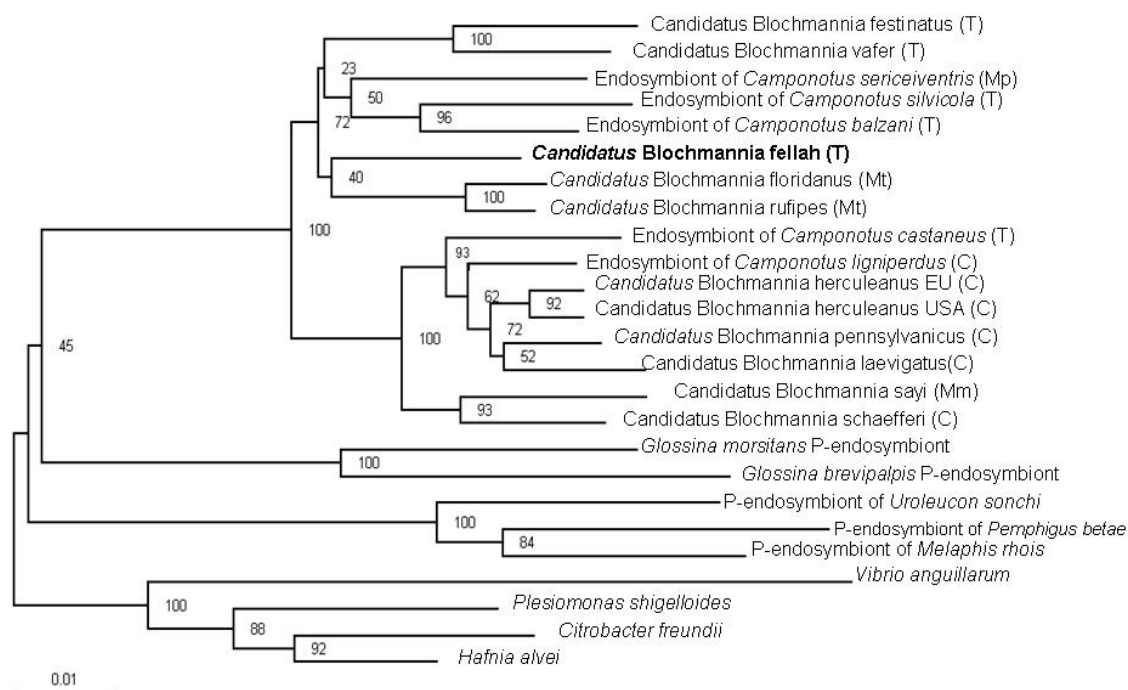
- Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. A. (1990).** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental-studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**,762-770.
- Blochmann, F. (1892).** Über das Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. *Zentralbl. Bakteriol.* **11**, 234–24.
- Bolton, B. (1995).** *A new general catalogue of the ants of the world*. Cambridge, Mass: Harvard University Press.
- Degnan, P. H., Lazarus, A. B., Brock, C. D. & Wernegreen, J. J. (2004).** Host-symbiont stability and fast evolutionary rates in an ant-bacterium association: Cospeciation of *Camponotus* species and their endosymbionts, *Candidatus Blochmannia*. *Syst Biol* **53**, 95-110.

- Degnan, P. H., Lazarus, A. B. & Wernegreen, J. J. (2005).** Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Res* **15**,1023-1033.
- Feldhaar, H., Straka, J., Krischke, M., Berthold, K., Stoll, S., Mueller, M. J. & Gross, R. (2007).** Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMC Biol* **5**, 48.
- Gaudermann, P., Vogl, I., Zientz, E., Silva, F. J., Moya, A., Gross, R., & Dandekar, T. (2006).** Analysis of and function predictions for previously conserved hypothetical or putative proteins in *Blochmannia floridanus*. *Bmc Microbiol* **6**.
- Gil, R., Silva, F. J., Zientz, E., Delmotte, F., Gonzalez-Candelas, F., Latorre, A., Rausell, C., Kamerbeek, J., Gadau, J., Holldobler, B., van Ham, R., Gross, R. & Moya, A. (2003).** The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9388-9393.
- Jukes, T. H. and Cantor , C. R. (1969).** Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. New York, NY: Academic Press.
- Sameshima, S., Hasegawa, E., Kitade, O., Minaka, N. & Matsumoto, T. (1999).** Phylogenetic comparison of endosymbionts with their host ants based on molecular evidence. *Zool Sci* **16**, 993-1000.
- Sauer, C., Dudaczek, D., Hölldobler, B. & Gross, R. (2002).** Tissue localization of the endosymbiotic bacterium "*Candidatus* Blochmannia floridanus" in adults and larvae of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Applied Environ Microbiol.* **68**, 4187-4193.
- Sauer, C., Stackebrandt, E., Gadau, J., Holldobler, B. & Gross, R. (2000).** Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus* Blochmannia gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**,1877-1886.
- Schroder, D., Deppisch, H., Obermayer, M., Krohne, G., Stackebrandt, E., Holldobler, B., Goebel, W. & Gross, R. (1996).** Intracellular endosymbiotic: Bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): Systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Mol Microbiol* **21**, 479-489.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2007).** Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5261-5267.

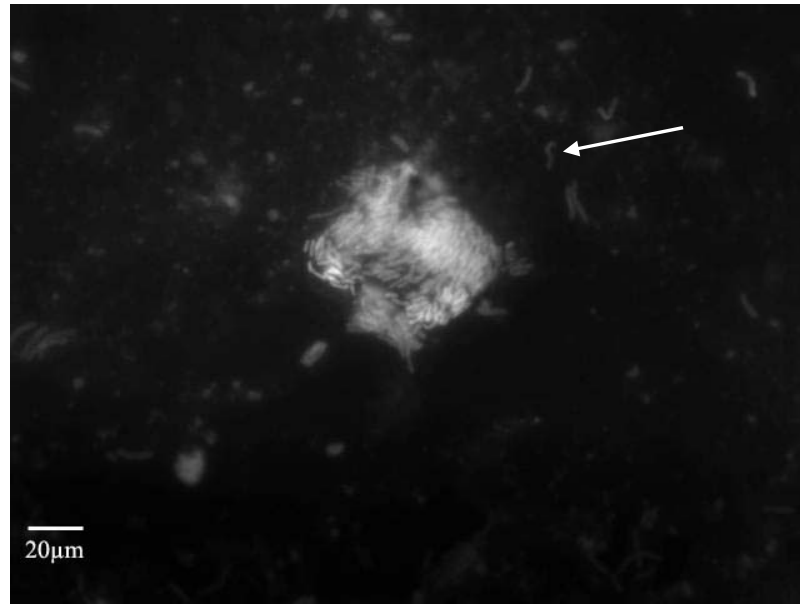
**Wernegreen, J. J., Degnan, P. H., Lazarus, A. B., Palacios, C. & Bordenstein, S. R.**  
**(2003).** Genome evolution in an insect cell: Distinct features of an ant-bacterial partnership. *Biol Bull* **204**, 221-231.

**Table 1.** Ant species, their geographical location and GenBank accession numbers for the 16S rDNA of their endosymbionts.

| <b>Species (subgenus)</b>                     | <b>Geographical origin</b> | <b>Accession no. (16S rDNA)</b> |
|-----------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) balzani</i>       | Madre de Dios, Peru        | AJ245596                        |
| <i>Camponotus (Myrmothrix) floridanus</i>     | Ft Pierce, Florida, USA    | X92549                          |
| <i>Camponotus (Camponotus) herculeanus</i>    | Idaho, USA                 | AJ250715                        |
| <i>Camponotus (Camponotus) herculeanus</i>    | Bavaria, Germany           | X92550                          |
| <i>Camponotus (Camponotus) pennsylvanicus</i> | USA                        | AF495758                        |
| <i>Camponotus (Myrmepomis) sericeiventris</i> | Misiones, Argentina        | AJ245593                        |
| <i>Camponotus (Camponotus) ligniperdus</i>    | Leinach, Germany           | X92551                          |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) silvicola</i>     | Cuzco Amazonico, Peru      | AJ245592                        |
| <i>Camponotus (Myrmothrix) rufipes</i>        | Rio, Brazil                | X92552                          |
| <i>Camponotus (Myrmentoma) sayi</i>           | Portal, AZ, USA            | AY334371                        |
| <i>Camponotus (Camponotus) schaefferi</i>     | Portal, AZ, USA            | AY334373                        |
| <i>Camponotus (Camponotus) laevigatus</i>     | Portal, AZ, USA            | AY334370                        |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) castaneus</i>     | Bayhead, Florida, USA      | AJ245594                        |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) vafer</i>         | Portal, AZ, USA            | AY334369                        |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) festinatus</i>    | Portal, AZ, USA            | AY196851                        |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) fellah</i>        | Tel-Aviv, Israel           | EF422835                        |



**Fig. 1.** The phylogenetic tree of ant endosymbionts including ‘*Candidatus Blochmannia fellah*’ and other close related insect endosymbionts based on their 16S rDNA sequences. The bar represents 0.01 inferred substitutions per site and numbers refer to bootstrap values of 1000 calculated trees. *Camponotus* subgenera are indicated by C=*Camponotus*, T=*Tanaemyrmex*, Mm=*Myrmentoma*, Mt=*Myrmothrix* and Mp=*Myrmepomis*.



**Fig. 2.** *In situ* hybridization with oligonucleotides specific for the *Blochmannia* endosymbionts in midgut preparation of *C. fellah* worker. Bc, Bacteriocyte with hybridizing bacteria, the arrow shows a bacterium.

Article 3 : en préparation pour PLOS One

# **Endosymbionts *Blochmannia* improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah***

Danival José de Souza\*, Annie Bézier, Jean-Michel Drezen, Alain Lenoir

<sup>1</sup>Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Université François Rabelais, Avenue Monge, Parc de Grandmont 37200, Tours, France

\* Corresponding author: danivalbr@yahoo.com.br



## Abstract

Symbionts can influence the life of their host in several ways. Symbiosis between ants and other species, including fungi, plants, other insects and bacteria, could explain the success of this conspicuous and highly diverse group of animals. *Camponotus*, one of the most numerous and diverse ant genus, has established an endosymbiotic relation with *Blochmannia*, a bacterial genus belonging to the  $\gamma$ -Proteobacteria group. *Blochmannia* live exclusively within specialized cells, the bacteriocytes, located in the midgut of workers, young virgin queens and males as well as in the oocytes of workers and queens. *Blochmannia* have a nutritional role in *Camponotus* species, but we hypothesized that the bacteria have others functions for the ants. Here, we demonstrated that *Blochmannia* have a positive effect on incipient colonies growth, favoring brood and workers production, confirming their role in nutrition of the ants. Furthermore, nylon beads encapsulation was positively correlated to bacteria amount in workers midgut, indicating that they favor host immune responses. It is the first time that primary endosymbiont bacteria are shown to participate to immune responses in a social insect.

## Introduction

An increasing set of data is shedding light on the role of microorganisms that have co-evolved with their hosts, including humans [1]. They illustrate the high diversity of endosymbiotic forms among living organisms. Moreover the evidence of gene transfer between bacterial cells or viruses and eukaryotic cells supports the theory of symbiotic relationships as a major force driving evolution [2] and as a source of phenotypic complexity [3] . Multiple new symbionts are regularly discovered in the same host, which can compete or cooperate [1,4]. Benefits and costs of group living is a central question in behavioural ecology. The aid of mutualistic endosymbiotic microbes in nutrition or defence against pathogens is an underappreciated benefit of group living both in invertebrates and vertebrates [5,6]. Social insects are particularly concerned as they have evolved in several ways collective defence against parasites [7].

Endosymbionts are very common among insects, especially in those sucking plant saps, feeding on vertebrate blood for their entire life span, and those that eat wood and keratin. As

they are all strict specialists in nourishment, it is assumed that endosymbionts play a role in providing complementary elements absent from these restricted diets. Among social insects, ants are particularly concerned as several species have evolved a wide range of interactions with other organisms, including plants [8], fungi [9], other insects [10] and bacteria [11,12]. *Camponotus* genus, carpenter ants, has established an association with intracellular endosymbionts *Blochmannia*, a taxon of  $\gamma$ -Proteobacteria, found in all *Camponotus* species studied hitherto [13]. The bacteria live within specialized cells, the bacteriocytes. The function of the endosymbionts is not fully elucidated but their role as dietary complement supplier has been pointed out after the genome sequence analysis of two *Blochmannia* species, revealing that the bacteria is able to supply nitrogen and sulphur compounds to the host [14-16]. Moreover, bacteria elimination using antibiotic treatment is deleterious and chemical defined diets can complement bacteria suppression [17,18] demonstrating the necessary nutritional role of bacteria. However, the presence of *Blochmannia* in omnivorous *Camponotus* species suggests that bacteria may also have other functions beneficial to the ants. Some studies have suggested that *Blochmannia* may play a more important role during colony founding phase and growth rather than in adult worker maintenance [19] or may play a role in pheromone production [20].

Any microbe that forms chronic infections in a host lineage may evolve to promote the host survival or to benefit its host, as this will help to maintain its immediate ecological resource [21]. In this context, some studies have showed that, beyond nutritional advantages, symbionts provide hosts with defences against parasites. For example, the aphid *Acyrtosiphon pisum* harbour the primary symbiont *Buchnera aphicola* and at least five others secondary symbionts: three  $\gamma$ -3 Proteobacteria, a *Rickettsia*, and a *Spiroplasma*. It was demonstrated that these secondary symbionts confer to the host a resistance to parasitism by the Braconidae *Aphidius ervi*, an endoparasitoid of aphids [22]. The diversity of species present in the *Schistocerca gregaria* locust gut protects it against infection by the pathogenic bacteria *Serratia marcescens* [23]. This result corroborates the ecological hypothesis that species-rich communities are more resistant to invasion than species-poor communities. Externally located bacteria are also capable to confer protection to insect hosts against parasite infections. It is the case for the solitary hunting wasp *Philanthus triangulum* that shelters *Streptomyces* bacteria in specialized antennal glands. Prior oviposition, females deposit the bacteria in the brood cell. Then, bacteria are acquired by the larvae, conferring brood protection against parasite fungus [24]. In the fungus growing ants, symbiotic bacteria

(*Pseudonocardia*) living externally on the cuticle, offer protection to the ants against the *Escovopsis* fungus, a parasite of their symbiotic fungus garden [25].

Here, we tested the hypotheses that *Blochmannia* provide faster colony development in the initial stages (incipient colonies) and/or improve the host immune system of the host. We used the encapsulation rate as an index of the immune response and analysed whether it was correlated with the number of bacteria. The use of incipient colonies, obtained from founding queens, is a suitable choice since it allows the study of animals of similar ages and reduces the effects of natural selection operating on colonies throughout their development.

## Results

### *Effectiveness of antibiotic treatment*

The quantity of *Blochmannia* in midgut bacteriocytes was estimated after Rifampin treatment using two complementary methods: real-time quantitative PCR and Fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The two methods showed a reduction of *Blochmannia* numbers in midgut bacteriocytes after 12-weeks of antibiotic treatment. Within this period, FISH did not detect the presence of *Blochmania* in the bacteriocytes (Fig. 1). However quantitative real-time PCR indicated that the bacteria were not eliminated, a low quantity of 16S rDNA bacteria molecules remaining in the midgut. Treated and control groups differed significantly in their content of *Blochmannia* measured as 16S rDNA molecules (Mann-Whitney's U-test=179.00,  $Z=-3.48$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 2). The treatment reduced by 75% the quantity of bacteria. Moreover the variation in bacteria abundance among control colonies was much more reduced in antibiotic treated colonies.

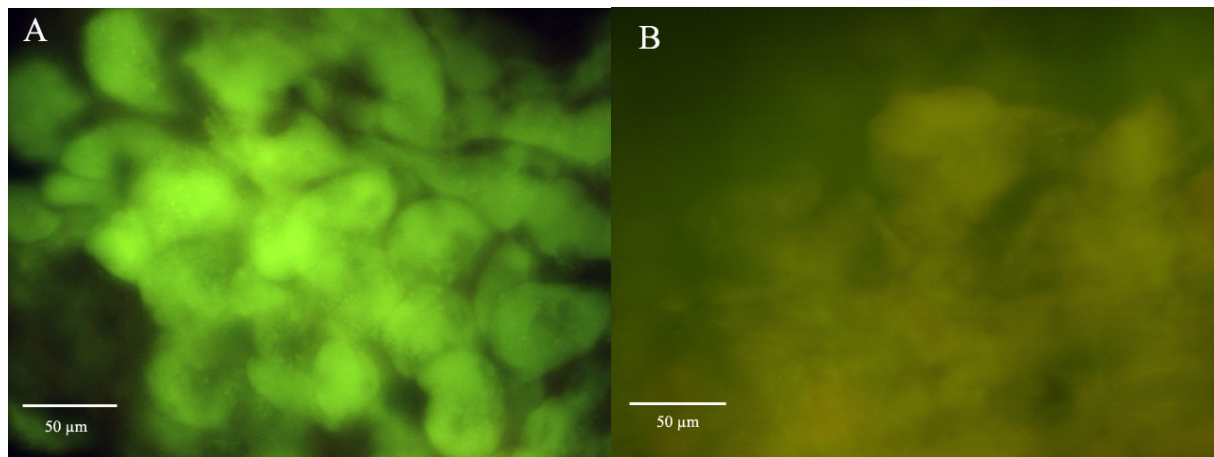


Fig. 1- *Blochmannia* specific fluorescent in situ hybridisation (FISH) of bacteriocytes (green) in *C. fellah* control worker(A) and Rifampin treated worker midguts(B). The bacteriocytes of treated worker are not well visible.

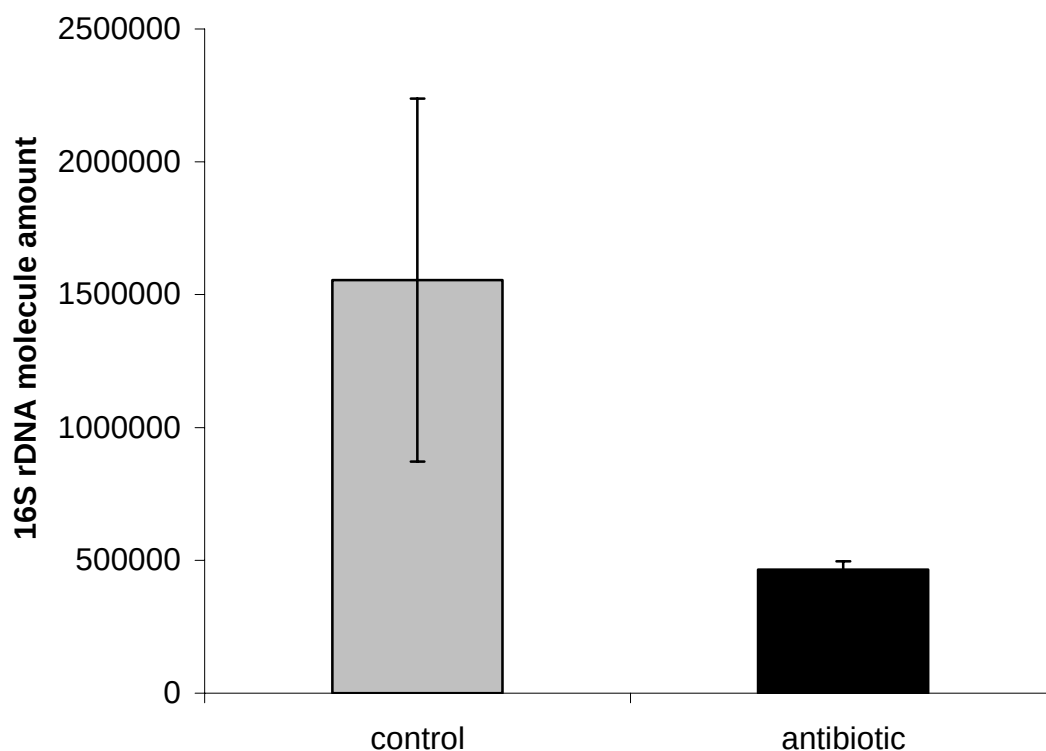


Fig. 2 –Endosymbionts number estimation in workers midguts, after 3 months of antibiotic treatment. Workers from treated group present a mean of bacteria significantly lower than the control group (Mann-Whitney's U-test=179.00,  $Z=-3.48$ ,  $p<0.001$ ). The bars represent the mean number of 16S rDNA molecules  $\pm$  semi-quartile range.

#### *Evaluation of the growth of colonies*

Each colony was composed of at least one larva, pupa or worker. Colonies composed only with the queen or colonies with queen dying during the experiment were excluded. After seven months, seven control colonies and nine treated colonies were kept for further analysis. Workers, larvae and pupae numbers were not significantly different during the first three months after the beginning of the experiments. After this time, untreated colonies displayed more accentuated larvae production and had a higher number of adult workers (Figure 3a,c see table 1, for all statistical results). Pupae number varied significantly throughout experiment time but no difference between treatment and control colonies was observed (Figure 3b). The variation in workers number was significantly different between treated and control colonies with untreated colonies having more workers (Figure 3c).

| <u>ANOVA main effects</u> |                        |                        |                  |
|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------|
| Mean number               | Antibiotic x control   | Time                   | Interaction      |
| larvae                    | $F_{1,112}=10.12^{**}$ | $F_{7,112}=6.08^{***}$ | $F_{7,112}=0.26$ |
| pupae                     | $F_{1,112}=2.79$       | $F_{7,112}=2.52^*$     | $F_{7,112}=1.20$ |
| workers                   | $F_{1,112}=5.53^*$     | $F_{7,112}=1.69$       | $F_{7,112}=0.75$ |

Table 1 – Mean number of larvae, pupae and workers analysed by ANOVA. Significance levels are \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  and \*\*\* $P\leq 0.001$ .

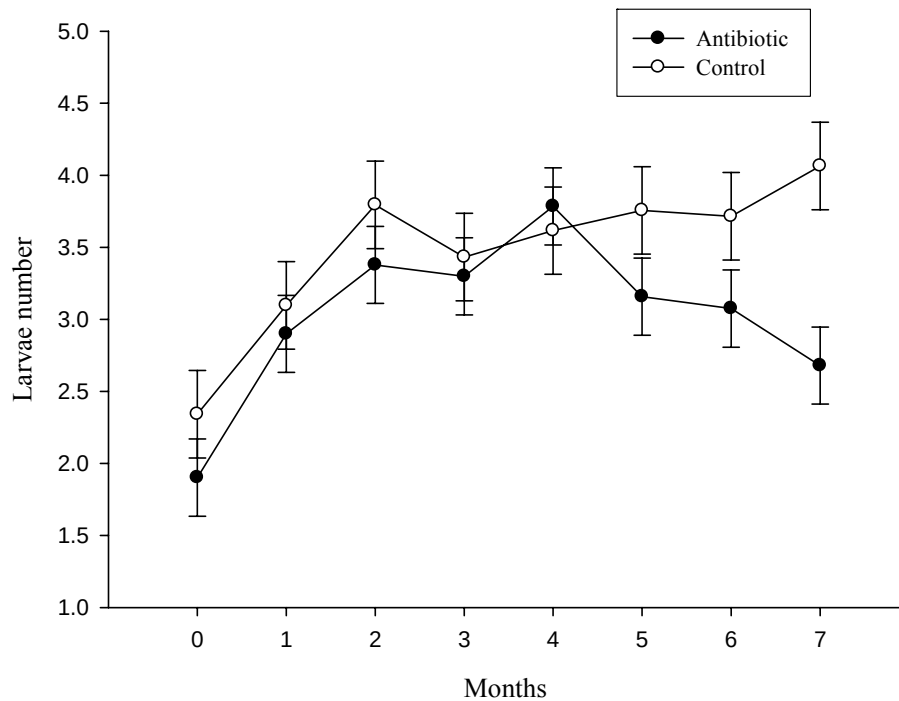


Fig. 3a –Mean larvae number, square-root transformed ( $\pm$  SE), for control and antibiotic-treated colonies. N=7 and 9, respectively.

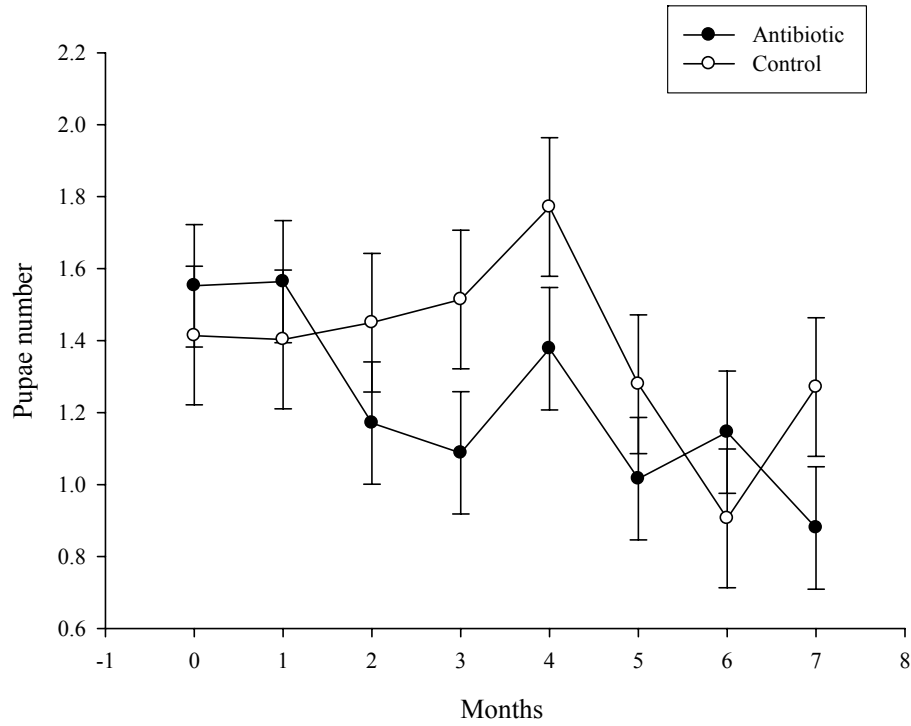


Fig. 3b – Mean pupae number, square-root transformed ( $\pm$  SE), for control and antibiotic-treated colonies. N=7 and 9, respectively.

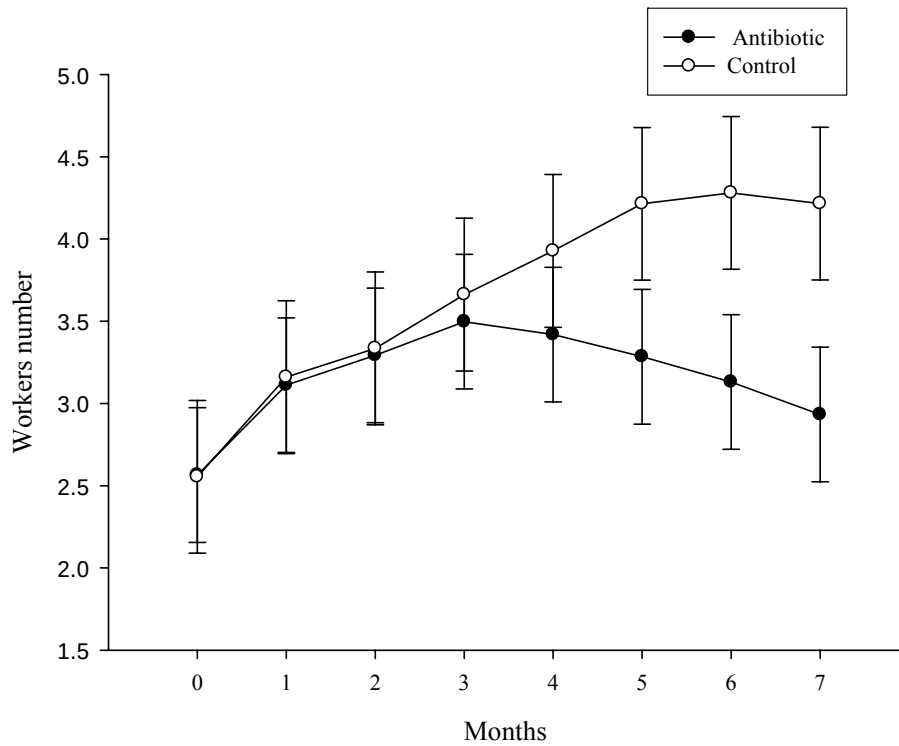


Fig. 3c - Mean worker number, square-root transformed ( $\pm$  SE), for the control and antibiotic-treated colonies. N=7 and 9, respectively.

#### *Amount of Blochmannia endosymbiont versus encapsulation response*

Considering the ants from control colonies A significant positive correlation was found: the bacteria did facilitate the encapsulation response (Pearson's  $r$ ,  $p=0.003$ , Fig. 4). On the contrary, ants from treated colonies did not display a correlation between the amount of bacteria in the midgut and the encapsulation response (Pearson's  $r$ ,  $p=0.92$ , Fig. 4). Thus, it seems that antibiotic treatment eliminated the bacterial effects on immune encapsulation response. An ANCOVA analysis with encapsulation rate as independent variable showed that treated workers present a significant increase on encapsulation rate ( $F_{1,53}=8.61$ ,  $p=0.005$ ). The regression inclinations of treated and control groups differed significantly ( $F_{1,52}=10.06$ ,  $p=0.003$ ).

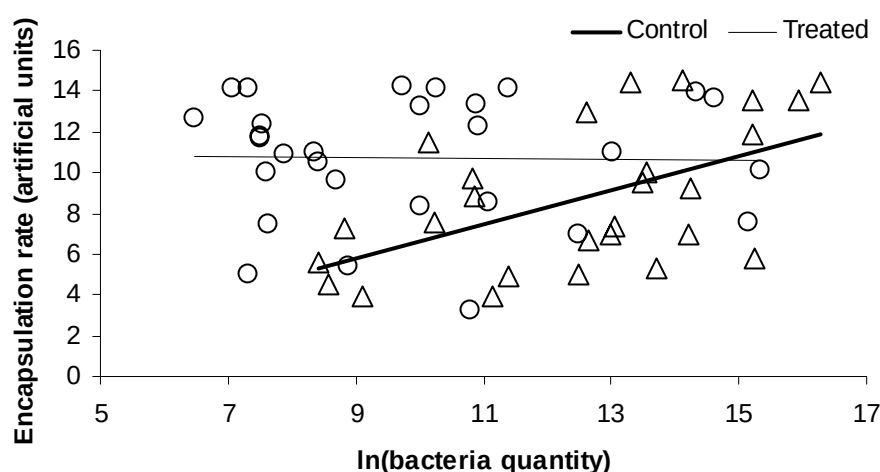


Fig. 4 – The relationship between amounts of *Blochmannia* endosymbiont, expressed as ln of 16S rDNA molecules for individual midgut, and the encapsulation response.  $\Delta$  represent the workers from untreated colonies (Pearson's  $r=0.55$ ,  $p=0.003$ ,  $n=27$ ) and O represent treated workers (Pearson's  $r=0.02$ ,  $p=0.92$ ,  $n=29$ ).



## Discussion

In this study, we confirmed that *Blochmannia* play an important role for *Camponotus* ants by improving the colony growth. We also demonstrated for the first time that *Blochmannia* interact with the immune defence of the ant.

Antibiotic treatment with Rifampin considerably reduced the endosymbiont number in the midgut, although they were never totally eliminated and there was a great variability between workers. This may be due to different access to the antibiotic and some of ants may not drink the antibiotic solution or, as observed by Feldhaar et al. (2007), may be explained by the fact that DNA of the endosymbiont may still be detectable by qRT-PCR when bacteria are not alive or active. It was verified that bacterial sequences were not integrated in the genome of the ant by a PCR test performed on DNA from ant legs using *Blochmannia* 16S rDNA and control ant 18S rDNA primers (data not shown). The treatment had a remarkable impact on colony development by reducing larvae production and workers number. Clearly, control colonies exhibited a bigger population in the first seven months of colony development. Since the establishment phase is critical for new colonies, harbouring more bacteria have major ecological consequences in a context of inter and intraspecific competition: more workers confers a special advantage to maintain a young colony, occupy and monopolize food resources. Indeed, animal protein food resources are more unpredictable in the time-space scale. Then, the *Blochmannia* presence signifies to the ants an adaptation to fluctuations in proteins availability, permitting the colonies growth even in absence of preys. We do not know the mechanisms permitting an increase in brood production, beyond the direct nutritional effects on treated queen, but several mechanisms are plausible, including a direct oogenesis control. For example, it has been demonstrated that *Wolbachia* bacteria are necessary for the host oogenesis in a particular strain of the parasitic wasp *Asobara tabida* [26]. Further, it was evidenced that apoptosis prevention of nurse cells by *Wolbachia* can regulates the host oogenesis [27].

The encapsulation rate measured for workers treated with Rifampin was significantly superior when compared to control colonies. Although no evident toxic effect (like increase of mortality) was observed, it is expected that antibiotic treatment has stressing effects on

workers and that the increase of the encapsulation rate might correspond to an adaptive response to stress. Furthermore, antibiotic treatment seemed to mask the effects of endosymbiont number on encapsulation response observed in control colonies, where the bacteria favoured the encapsulation response. Positive effects of symbionts on host immune system have been described in the last years. For example, the facultative symbionts of *Acyrtosiphon pisum* (the pea aphid) confer it resistance to parasitoid attacks [22]. The mechanisms by which the resistance is expressed is still unknown, but in another example it was showed that symbiotic bacteria could compete directly for space and resources and thus prevent host colonization by pathogens [23,28].

Encapsulation is the principal physiological response against parasitoids suggesting an important role of the stimulation induced by *Blochmannia* in the protection against parasites. This strong interaction between symbiotic bacteria and the ants may explain the persistence and broadly occurrence of symbiotic bacteria in the *Camponotus* genus. Ants from *Camponotus* genus are abundant almost everywhere in the world where ants are found, comprising >600 described species within an estimated number > 1,000 species [29]. Its large distribution, the diversity of forms and food behaviour and the occurrence on diverse environments make the system *Camponotus/Blochmannia* an interesting model to study how ecological forces determine symbiont characteristics and how bacteria determine the ant traits. For example, it is interesting determine how genetic differences found among different species of *Blochmannia* could be related to host ecological characteristics.

Phoridae flies are frequently found around *Camponotus* nests and their influence is fundamental in regulating the ant communities [30]. So, it can be expected that *Camponotus* species more exposed to Phoridae attack should harbour more bacteria. The mechanism linking bacterial amount and encapsulation response remains unknown. Although the better workers “quality” due to extra nutrients furnished by bacteria is the more probable explanation, direct production of biomolecules in stress situation should not be excluded. Indeed, it was recently demonstrated that endosymbionts can activate the host peptidoglycan recognition proteins (PGRP) in certain developmental phases [31] and this could have consequences on host immunity.

The analysis of the two sequenced genome of *Blochmannia* revealed the presence of a transcription factor involved in induction of stress response proteins, such as chaperones [15,16]. These proteins might be involved in eliciting specific immunity to infectious agents [32]. An efficient immune system is a major trait allowing the existence of social insect colonies with thousand of individuals, genetically related, living close together [33], constantly exposed to parasitic disease risks. Competition in the first stages of colony growth constitutes also a great challenge to reach the reproductive stage. Thus, *Blochmannia* endosymbionts appear to be a fundamental partner, responsible for the ecological success of *Camponotus* ants. As more than 10% of insect species depend on obligate bacterial mutualists for their viability and reproduction [34], the research on symbiosis between bacteria and animals appears to be a new and promising field, particularly in social insects.

## **Materials and Methods**

### *Symbiont identification*

The endosymbiont of *Camponotus fellah* present in bacteriocytes has not been formally described (in preparation), but it was identified as a *Blochmannia* by sequencing a 1500-bp-length fragment of 16S rDNA and confirmed as a new species of  $\gamma$ -Proteobacteria group after checking the Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>). The sequence has been deposited in the GenBank database under EF422835 accession number.

### *Camponotus fellah: sampling sites and culture*

Founding queens of *Camponotus fellah* were collected in Tel-Aviv in March 2006 and 2007. Colonies were kept in plastic containers (20 x 20 x 10 cm) with plaster nests in a climate chamber (constant temperature of 28°C, 12 h light per day), and were fed twice a week with *Tenebrio molitor* larvae and commercial honey solution (BeeHappy®, France). In 2006 and 2007 we used 10 control colonies (feeding with *Tenebrio* and honey) and 10 treated colonies (feeding with *Tenebrio* and honey in the first week, and *Tenebrio* larvae and honey solution containing 1% of the antibiotic Rifampin the second week and after). In previous studies on other *Camponotus* species [35] Rifampin was shown to reduce the number of

bacteria without increasing mortality and did not cause damage to the midgut tissues of the ants. The treatment was maintained during three months.

Because the occurrence of *Wolbachia* is widespread in the ants [36] and these symbiotic bacteria can have negative effects on immunity-related traits of insects [37], we their incidence was checked in our *C. fellah* colonies, using two pairs of primers based on *Wolbachia ftsZ* sequences [36], so as to amplify A and B-group *Wolbachia* specific product developed to amplify A and B-group *Wolbachia* [36]. No incidence of *Wolbachia* was detected.

#### *Evaluation of the growth of colonies*

Colonies collected in 2006 were used to evaluate the growth of control colonies *versus* treated colonies. Over a period of seven months (including the first three months of antibiotic treatment) the number of brood (larvae and pupae) and the workers in each colony were counted each month, performing 7 observations.

#### *Encapsulation rate assay*

To measure the immune response of the ants, an encapsulation test was performed by inserting a 1.5 mm long piece of nylon monofilament (0.12 mm diameter) in the pleural membrane between the second and third tergite. This procedure was carried out on 3 workers from each colony, with a total of 30 workers for each group, based on the procedures adopted by Rantala & Kortet [38]. Twenty four hours after, the implants were removed from the haemocoel and placed on a glass slide to be mounted into Clarion™ medium. The filament was examined under a light microscope and photographed using a digital camera (Olympus DP50). The mean grey value of the whole implant was measured using the ImageJ 1.37v software. We assumed that the darkest grey received the highest encapsulation rate (total black). The background grey value was subtracted to correct the values of the implants. We dissected the midgut of each worker in sterile PBS (137 mM NaCl-2.7 mM KCl-4.3 mM sodium phosphate-1.4 mM potassium phosphate, pH 7.2) and conserved it isolated in Eppendorf tube at -20C° for quantitative PCR.

### *Real time qPCR*

DNA was isolated from the whole midgut of individual worker that were previously tested for encapsulation rate (see Encapsulation assays) using DNA extraction commercial kit (Gentra Systems Puregene©, Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's recommendations then resuspended in 20 µl double distilled water. Quantitative PCR reactions were performed in presence of SYBR Green on ABI Prism 7000 gene expression system according to the manufacturers' instructions (Applied Biosystems, France) using 5-time dilution of each DNA extraction corresponding to approximately 50 to 70 ng total DNA. Bacteria were quantified using specific primers designed to amplified a 16S rDNA 150-bp-length fragment (16SFor 5'-AGAATTCCAGGTGTAGCGGTG-3' and 16SRev 5'-TACGGCATGGACTACCAGGG-3'). Ants were quantified using specific primers designed to amplified a 18S rDNA 150-bp-length fragment (18SFor 5'-TTAGAGTGCTTAAAGCAGGC-3' and 18SRev 5'-ACCTCTAACGTCGCAATACG-3'). These primers were efficiently used in another study with *Blochmannia floridanus* [17]. Each gene absolute copy number was expressed using the standard curve method. Then bacteria 16S rDNA copy number was normalized to the same quantity of *Camponotus* ants 18S rDNA-copy number used as internal reference.

### *Fluorescent In Situ hybridisation (FISH)*

In order to assess the effect of the antibiotic treatment, bacteriocyte were visualized by FISH with oligonucleotide probes Eub338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') [39], targeting a conserved region of the eubacterial 16S rRNA, and with Bfl172 (5'-CCTATCTGGGTTCATCCAATGGCATAAGGC-3'), targeting a 16S rRNA region specific for *B. floridanus* [18] that was successfully used to hybridise with *C. fellah* *Blochmannia* endosymbiont. 16S rRNA probes were labelled with the fluorescent dyes Cy3 or FITC at the 5' end (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Germany) as previously described [18]. The slides were analyzed with an Olympus BX51 microscope (Olympus, United Kingdom). Photographs were taken with a DP50 digital camera (Olympus, Singapore).

## Acknowledgments

We thank Danielle Mersch and Stephane Dorsaz from Lausanne University and Abraham Hefetz from Tel-Aviv University for collection of the mated queen ants. Heike Feldhaar and Sascha Stoll from Wurzburg University aided us on FISH and Quantitative PCR techniques. The first author was financially supported by grants from the Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil).

## References

1. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA (2007) An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449: 811-818.
2. Margulis L, Fester R (1991) Symbiosis as a source of evolutionary innovation - speciation and morphogenesis; Margulis L, Fester R, editors: MIT Press. 470 p.
3. Moran NA (2007) Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 8627-8633.
4. Vautrin E, Genieys S, Charles S, Vavre F (2008) Do vertically transmitted symbionts co-existing in a single host compete or cooperate? A modelling approach. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 145-161.
5. Lombardo M (2008) Access to mutualistic endosymbiotic microbes: an underappreciated benefit of group living. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 479-497.
6. Krause J, Ruxton GD (2002) *Living in groups*. New York: Oxford University Press. 240 p.
7. Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P (2007) Social Immunity. *Current Biology* 17: R693-R702.
8. Davidson DW, McKey D (1993) The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *Journal of Hymenoptera Research* 2: 13-83.
9. Mueller UG, Rehner SA, Schultz TR (1998) The evolution of agriculture in ants. *Science* 281: 2034-2038.
10. Pierce NE, Braby MF, Heath A, Lohman DJ, Mathew J, et al. (2002) The ecology and evolution of ant association in the Lycaenidae (Lepidoptera). *Annual Review of Entomology* 47: 733-771.

11. Zientz E, Feldhaar H, Stoll S, Gross R (2005) Insights into the microbial world associated with ants. *Archives of Microbiology* 184: 199-206.
12. Zientz E, Dandekar T, Gross R (2004) Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 745-+.
13. Degnan PH, Lazarus AB, Brock CD, Wernegreen JJ (2004) Host-symbiont stability and fast evolutionary rates in an ant-bacterium association: Cospeciation of *Camponotus* species and their endosymbionts, *Candidatus Blochmannia*. *Systematic Biology* 53: 95-110.
14. Gaudermann P, Vogl I, Zientz E, Silva FJ, Moya A, et al. (2006) Analysis of and function predictions for previously conserved hypothetical or putative proteins in *Blochmannia floridanus*. *Bmc Microbiology* 6.
15. Degnan PH, Lazarus AB, Wernegreen JJ (2005) Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Research* 15: 1023-1033.
16. Gil R, Silva FJ, Zientz E, Delmotte F, Gonzalez-Candelas F, et al. (2003) The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 9388-9393.
17. Zientz E, Beyaert N, Gross R, Feldhaar H (2006) Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6027-6033.
18. Feldhaar H, Straka J, Krischke M, Berthold K, Stoll S, et al. (2007) Nutritional Upgrading for Omnivorous Carpenter Ants by the Endosymbiont *Blochmannia*. *BMC Biology* 5: 48.
19. Wernegreen JJ, Degnan PH, Lazarus AB, Palacios C, Bordenstein SR (2003) Genome evolution in an insect cell: Distinct features of an ant-bacterial partnership. *Biological Bulletin* 204: 221-231.
20. Sauer C, Stackebrandt E, Gadau J, Holldobler B, Gross R (2000) Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1877-1886.
21. Moran NA (2006) Symbiosis. *Current Biology* 16: R866-R871.

22. Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 1803-1807.
23. Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK (2005) Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters* 8: 1291-1298.
24. Kaltenpoth M, Gottler W, Herzner G, Strohm E (2005) Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology* 15: 475-479.
25. Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D (1999) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701-704.
26. Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME, et al. (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 6247-6252.
27. Pannebakker BA, Loppin B, Elemans CPH, Humblot L, Vavre F (2007) Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 213-215.
28. Gilturmes MS, Hay ME, Fenical W (1989) Symbiotic marine-bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* 246: 116-118.
29. Hölldobler B, Wilson EO (1990) *The ants*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press. xii + 732 p.
30. Feener JDH (2000) Is the assembly of ant communities mediated by parasitoids? *Oikos* 90: 79-88.
31. Anselme C, Vallier A, Balmand S, Fauvarque M-O, Heddi A (2006) Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6766-6772.
32. Pockley AG (2003) Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet* 362: 469-476.
33. Wernegreen JJ, Lazarus AB, Degnan PH (2002) Small genome of *Candidatus* Blochmannia, the bacterial endosymbiont of *Camponotus*, implies irreversible specialization to an intracellular lifestyle. *Microbiology-Sgm* 148: 2551-2556.
34. Wernegreen JJ (2002) Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics* 3: 850-861.
35. Sauer C, Dudaczek D, Hölldobler B, Gross R (2002) Tissue localization of the endosymbiotic bacterium "*Candidatus* Blochmannia floridanus" in adults and larvae



- of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4187-4193.
36. Wenseleers T, Ito F, van Borm S, Huybrechts R, Volckaert F, et al. (1998) Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 265: 1447-1452.
37. Fytrou A, Schofield PG, Kraaijeveld AR, Hubbard SF (2006) *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 791-796.
38. Rantala MJ, Kortet R (2003) Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 503-510.
39. Amann RI, Krumholz L, Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental-studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172: 762-770.

Article 4 : en préparation

**Title: A trade-off between endosymbiont bacteria and cuticular hydrocarbons in the ant *Camponotus fellah***

**Abbreviated title: Endosymbiont bacteria and cuticular hydrocarbons in *Camponotus***

Danival Souza <sup>1\*</sup>, Séverine Devers <sup>1</sup> and Alain Lenoir <sup>1</sup>

<sup>1</sup> IRBI, Institut de recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Université François Rabelais, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

\* Corresponding author

Keywords: *Blochmannia*, immunity, antibiotic, sclerotization.

## Summary

Carpenter ants *Camponotus* have endosymbiont bacteria which have mainly an alimentary contribution to their hosts. It was recently demonstrated that they have also a role in immune functions (Souza et al, in prep). After an antibiotic treatment, the ants may have a nutritive deficit and a deficient immune system, inducing a stress which provokes an increase in the cuticular hydrocarbons quantities. We suggest that the bacteria / ant symbiosis is part of a trade-off in life-history traits of the ants. The increase of hydrocarbon quantities will enhance the cuticular protection to desiccation, but also enhance protection against invasions of pathogens and parasites as the immune system is lowered. The nestmate recognition system due to the cuticular hydrocarbon profile is not modified by the antibiotic treatment.

## Introduction

Trade-offs in life-history traits are now well studied. A major challenge in biology is understanding how organisms partition limited resources among physiological processes. Trade-offs between reproduction and immunity are now well studied in vertebrates (see for example (French et al., 2007)) and this field is arising in invertebrates (Lawniczak et al., 2007). For example, the pea aphid is frequently attacked by parasitoids and develops a resistance to the parasite with the help of symbiotic bacteria. Immunity to parasitoid attack is costly as the individuals carrying the symbionts have fewer offspring. Therefore, a trade-off takes place between defence and reproduction (Gwynn et al., 2005). In social insects, aside from in bumblebees (Baer et al., 2006; Baer et al., 2005), the cost of immune response has been little studied. New data on *Apis mellifera* suggest also a trade-off between the maintenance of potentially beneficial bacterial symbionts and deterrence of pathogenic bacteria (Evans et Lopez, 2004; Evans et Armstrong, 2006).

Carpenter ants (*Camponotus* genus) have established an association with intracellular endosymbionts *Blochmannia* ( $\gamma$ -Proteobacteria), found in all species studied hitherto (Degnan et al., 2004; Sauer et al., 2000). The function of the endosymbionts is not totally elucidated but their role as dietary complement supplier was evidenced after the analysis of the genome sequence of two species of *Blochmannia* (Degnan et al., 2005; Gaudermann et al., 2006; Gil et al., 2003) and experiments eliminating the bacteria by antibiotic administration and utilization of chemically defined diets (Feldhaar et al., 2007; Zientz et al., 2006). However, the apparent ability of ants to survive without *Blochmannia* (Sauer et al., 2000) and the omnivorous behaviour of several *Camponotus* species suggested others functions of bacteria

to the ants. We demonstrated recently that *Blochmannia* may be important during colony founding phase and that the bacteria have a role in the ant immune response (Souza et al., in prep)(Sauer et al., 2000).

Here, we predicted that the bacteria symbionts have a cost for the host ants. It is well known that the cuticular surface chemicals, mainly hydrocarbons, have a protective role against desiccation in insects (Gibbs, 1998; Singer et Espelie, 1998). These lipids have also an underestimated role of protection against pathogens (Larsson et al., 1975). We tested the effects of an antibiotic treatment, eliminating or reducing largely the endosymbiotic bacteria quantity, on the chemical profiles of the ants and on the cuticular hydrocarbon quantities.

## **Material and methods**

### **The ants**

Founding queens of *Camponotus fellah* were collected by Dr. Abraham Hefetz in Tel-Aviv in March 2007. Colonies were kept in plastic containers (20 x 20 x 10 cm) with plaster nests in a climate chamber (constant temperature of 28°C, 12 h DL), and were fed twice a week with *Tenebrio molitor* larvae and commercial honey solution (BeeHappy®). We used 10 control colonies (feeding with *Tenebrio* and honey) and 10 treatment colonies (feeding with *Tenebrio* and honey in the first week, and *Tenebrio* larvae and honey solution containing 1% of the antibiotic Rifampicin in the second week and after). The treatment was maintained during three months. Rifampin had a significant effect in reducing bacteria without supplementary mortality and the immune level measured by the encapsulation response was correlated to the quantities of bacteria (Souza et al, in prep.)

### **Chemical analyses**

The thorax with the legs taken from dissected workers was immersed in 1 ml of pentane for 5 min. The thorax was removed and 5 µl of pentane containing 50ng of eicosane (C20) was added as an internal standard. For analyses, the solvent was evaporated until the remaining 5 µl which were injected to a FID gas-chromatograph (VGM250Q system, Perkin-Elmer) using a DB-5 fused silica capillary column. Temperature was kept at 150°C during the splitless initial two minutes, raised from 150°C to 310°C at 5°C/min and held at 310°C for the last 10 min. The non volatiles cuticular lipids were identified previously (Boulay et al., 2000). To identify also smaller peaks, we analysed in more details the cuticular profile with the same GC coupled to a Perkin-Elmer MS operating 70 EV. We used a high temperature column to identify the peaks with more than 30 carbons (DB-5HT, 30m, 0.251mm x 0.10µm). The

temperature program was 2 min at 100°C; 6°C / min until 350°C and maintained for 5 min. The areas of peaks were estimated by peak integration using a TurboChrome Workstation. From the area, we calculated the quantities of substances using the internal standard area (ng per thorax) and their relative proportions. Hydrocarbon classes in % and total quantities were compared with Mann-Whitney U test. Data expressed in % are used with the Arcsine (square root) transformation (Sokal et Rohlf, 1995). The profiles between the two groups were compared with a dendrogram, using single-link Ward method and Euclidian distance. We had 27 experimental and 31 control ants.

## Results

The chemical profile of the thorax cuticle was identical to previously published data. We recorded 62 peaks, 58 were identified of which 43 were new ones, including all components with more than 32 carbons that were not previously described with a total of 9% (table 1 and Fig. S1). All were hydrocarbons unless a trace of one ester. There were three major peaks in the C27 serie: C27 ( $14.6 \pm 4.3\%$ ), 3C27 ( $25.3 \pm 2.9\%$ ) and 7C27 ( $7.7 \pm 1.2\%$ ), and 16 peaks were comprised between 1 and 5%. All the other peaks were less than 1%, and must be considered as traces and were not detectable in all the individual extracts due to the sensitivity of our GC, but their role may be important. When comparing the profiles of treated and control ants, we did not find qualitative difference; all the substances were present in both types. The main classes are n-alkanes ( $25.76 \pm 6.22\%$ ), methyl-alkanes ( $50.03 \pm 3.41\%$ ), dimethyl-alkanes ( $17.29 \pm 3.29\%$ ), trimethyl-alkanes ( $3.76 \pm 1.12\%$ ) and a few alkenes ( $0.28 \pm 0.15\%$ ) (Fig.1; Table 1). When we compared these classes, we did not find differences between treated and controls (all *P* values > 0.25). The dendrogram did not separate the two groups; the ants were placed indifferently in the control or the treatment group (data not shown). These data indicate that the cuticular profile of the ants did not change under the antibiotic influence. On the contrary, the total quantity of hydrocarbons was modified: the antibiotic treated ants had significantly more hydrocarbons on their cuticle ( $459.6 \pm 260$  vs  $300.5 \pm 159$  ng / ant respectively, *P* = 0.007, Mann-Whitney U test; Fig. 2).

## Discussion

Contrarily to our predictions, the cuticular hydrocarbon profile did not change after antibiotic treatment. Only one research indicated a link between the intestinal bacteria and nestmate recognition in the termite *Reticulitermes speratus* (Matsuura, 2001), but it is a particular case as nestmate recognition in these insects is directly dependant of nutrition. In *C. fellah*, the cuticular profile is very stable. The profile remains similar for colonies collected in different years in the same place in Israel (see (Boulay et al., 2000)). The antibiotic treatment suggests that nestmate recognition in these ants is not related to the endosymbiont bacteria. It has been shown that the bacteria quantity decreases with the ant age (Wolschin et al., 2004), and therefore it is logical that recognition is maintained independently of the symbionts.

In ants, cuticular hydrocarbons quantity increases with the age and stabilizes at maturity when the ants are one month old (see ref in (Lenoir et al., 2001)). In *Polistes* wasps the quantity also increases during the first 3 days (Lorenzi et al., 2004). It is the first time that a quantitative modification is correlated to an antibiotic treatment, independently of the age. Data on the quantities of hydrocarbons are scarce. For example, the tropical ant *Ectatomma ruidum* has very few (125-200ng / worker) (Jeral et al., 1997) whereas *Cataglyphis niger*, an ant well adapted to hot and dry climates has 15 to 50µg per ant (ie 1/1 000 of the body weight) (Lahav et al., 1998).

Composition and quantity of epicuticular lipids function to water proof the cuticle, and therefore play a role in the desiccation resistance (Hadley, 1972; Lockey, 1988). Long chain compounds are generally thought to enhance desiccation resistance, although it is not always the case (reviewed by (Gibbs, 1998)). Arthropods dwelling in warm, dry environments like desert *Drosophila* tend to have hydrocarbons of longer chain length than their counterparts in more mesic environments (Gibbs et al., 1998). Environmental conditions experienced by ants in different task groups may induce changes in the cuticle. Workers that perform outside tasks are more exposed to higher temperatures, lower humidity and ultraviolet light. In the ant *Pogonomyrmex barbatus*, the relative abundance of n-alkanes was 20% higher in foragers and patrollers than on nest maintenance workers. This may enhance the desiccation resistance of workers exposed to the desert environment. However, in this study, the foragers did not have alkanes of longer average (Wagner et al., 1998). In the same species, the percent composition of founding queens changed with the founding stage, but the total quantity of hydrocarbons did not changed (Johnson et Gibbs, 2004). In *Ectatomma ruidum*, foragers engaged in thief behaviour into foreign colonies have less quantities of cuticular compounds (Jeral et al.,

1997). To conclude, the increase in hydrocarbons quantity in antibiotic treated workers of *Camponotus fellah* may enhance protection against desiccation.

*What may be the relation between antibiotic treatment and hydrocarbons quantity?*

*Camponotus* ants possess endosymbiont *Blochmannia* bacteria in their digestive apparatus. New interest has arisen with sequencing the bacteria which has confirmed their digestive role for providing amino-acids (Feldhaar et al., 2007). We showed that the antibiotic treatment reduced the bacteria number. In these conditions, the ants had a nutritive deficit and a deficient immune system, indicating a stress (Souza et al, in prep). We suggest that the ants made a trade-off to compensate these deficiencies by increasing their cuticular protection to desiccation, but also to be more protected against potential invasions of pathogens and parasites as their immune system is lowered. It is well-known that highly sclerotized cuticle can block microbial invasion (Hopkins, 1992). It has been shown that the epicuticular lipids have also an antiseptic function (Larsson et al., 1975), therefore increasing the hydrocarbons quantities may better protect the ant. Such a trade-off between immune activation and life-history traits like body size and development time or survival and reproduction has been observed recently in the field cricket *Gryllus bimaculatus* (Ahtiainen et al., 2005), the bumblebee (Doums et Schmid-Hempel, 2000; Moret et Schmid-Hempel, 2000) and the pea aphid (Gwynn et al., 2005). The honey bee has numerous non-pathogenic bacteria that can be used as probiotic to respond attacks from pathogens (Evans et Lopez, 2004; Evans et Armstrong, 2006), but these bacteria are probably free-living and not real endosymbionts. It is the first time that such a trade-off between immune response and endosymbiont bacteria is evidenced in social insects. It remains to understand the proximal mechanisms involved here.

**Acknowledgments.** We thank Abraham Hefetz for the ant queens collection, Guy Bourdais for help in ant maintenance; Raphael Boulay for the help in data analysis.



## References

- Ahtiainen J.J., Alatalo R.V., Kortet R. and Rantala M.J. 2005. A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *J.Evol. Biol.* 18:985-991
- Baer B., Armitage S.A.O. and Boomsma J.J. 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* 441:872-875
- Baer B., Krug A., Boomsma J.J. and Hughes W.O.H. 2005. Examination of the immune responses of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. *Insect. Soc.* 52:298-303
- Boulay R., Hefetz A., Soroker V. and Lenoir A. 2000. *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbons exchanges. *Animal Behaviour* 59:1127-1133
- Degnan P.H., Lazarus A.B. and Wernegreen J.J. 2005. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Res.* 15:1023-1033
- Degnan P.H., Lazarus A.B, Brock C.D. and Wernegreen J.J. 2004. Host-symbiont stability and fast evolutionary rates in an ant-bacterium association: Cospeciation of *Camponotus* species and their endosymbionts, *Candidatus Blochmannia*. *Syst. Biol.* 53:95-110
- Doums C. and Schmid-Hempel P. 2000. Immunocompetence in workers of a social insect, *Bombus terrestris* L., in relation to foraging activity and parasitic infection. *Can. J. Zool.* 78:1060-1066
- Evans J.D., and Lopez D.L. 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 97:752-756.
- Evans J.D. and Armstrong T-N. 2006. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecol.* 6
- Feldhaar H., Straka J., Krischke M., Berthold K., Stoll S., Mueller M., and Gross R. 2007. Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMB Biology*:5:48
- French S.S., DeNardo D.F. and Moore M.C. 2007. Trade-offs between the reproductive and immune systems: Facultative responses to resources or obligate responses to reproduction? *Am. Nat.* 170:79-89

- Gaudermann P., Vogl I., Zientz E., Silva F.J., Moya A., Gross R. and. Dandekar T. 2006. Analysis of and function predictions for previously conserved hypothetical or putative proteins in *Blochmannia floridanus*. *Bmc Microbiology* 6
- Gibbs A.G. 1998. Water-Proofing properties of cuticular lipids. *Am. Zool.* 38:471-482
- Gibbs A.G., Louie A.K. and Ayala J.A. 1998. Effects of temperature on cuticular lipids and water balance in a desert *Drosophila*: is thermal acclimation beneficial? *J. Exp. Biol.* 201:71-80
- Gil R., Silva F.J., Zientz E., Delmotte F., Gonzalez-Candelas F., Latorre A., Rausell C., Kamerbeek J., Gadau J., Holldobler B., van Ham R., Gross R. and Moya A.. 2003. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100:9388-9393
- Gwynn, D.M., A. Callaghan, J. Gorham, K.F.A. Walters, and M.D.E. Fellowes. 2005. Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 272:1803-1808
- Hadley M. 1972. Perspectives in productivity studies, with special reference to some social insect populations. *Ekol. Pol.* 20:173-184
- Hopkins T.L. 1992. Insect cuticle sclerotization. *Annu. Rev. Entomol* 37:273-302
- Jeral J.M., Breed M.D. and Hibbard B.E. 1997. Thief ants have reduced quantities of cuticular compounds in a ponerine ant, *Ectatomma ruidum*. *Physiol. Entomol.* 22:207-211
- Johnson, R.A., and A.G. Gibbs. 2004. Effect of mating stage on water balance, cuticular hydrocarbons and metabolism in the desert harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *J. Insect Physiol.* 50:943-953
- Lahav S., Soroker V., Vander Meer R.K. and Hefetz A. 1998. Nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*: do queens matter? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43:203-212
- Larsson K., Norén B. and Odham G. 1975. Antimicrobial effect of simple lipids with different branches at the methyl end group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8:742-750
- Lawniczak M.K.N., Barnes A.I., Linklater J.R, Boone J.M., Wigby S. and T. Chapman. 2007. Mating and immunity in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 22:48-55
- Lenoir A., D'Ettorre P., Errard C. and A. Hefetz. 2001. Chemical ecology and social parasitism in ants. *Annu. Rev. Entomol.* 46:573-599
- Lockey K.H. 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B* 89:595-645
- Lorenzi M.C., Sledge M.F., P. Laiolo, E. Sturlini, and S. Turillazzi. 2004. Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and

- the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. *J. Insect Physiol.* 50:935-941
- Matsuura K., Kuno E. and Nishida T. 2002. Homosexual tandem running as selfish herd in *Reticulitermes speratus*: novel antipredatory behavior in termites. *J. Theor. Biol.* 214:63-70
- Moret Y. and Schmid-Hempel P. 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290:1166-1168
- Sauer C., Stackebrandt E., Gadau J., Holldobler B. and Gross R. 2000. Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1877-1886
- Singer T.L. and Espelie K.E. 1998. Nest and nestmate recognition by a fungus-growing ant, *Apterostigma collare* Emery (Hymenoptera: Formicidae). *Ethology* 104:929-939
- Sokal R.R. and Rohlf.F.J. 1995. *Biometry*. Freeman and Co, New York. 887 pp
- Wagner D., Brown M.J.F., Broun P., Cuevas W., Moses L.E., Chao D.L. and Gordon D.M. 1998. Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *J. Chem. Ecol.* 24:2021-2037
- Wolschin F., Holldobler B., Gross R. and Zientz E. 2004. Replication of the endosymbiotic bacterium *Blochmannia floridanus* is correlated with the developmental and reproductive stages of its ant host. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4096-4102
- Zientz E., Beyaert N., Gross R. and Feldhaar H. 2006. Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6027-6033

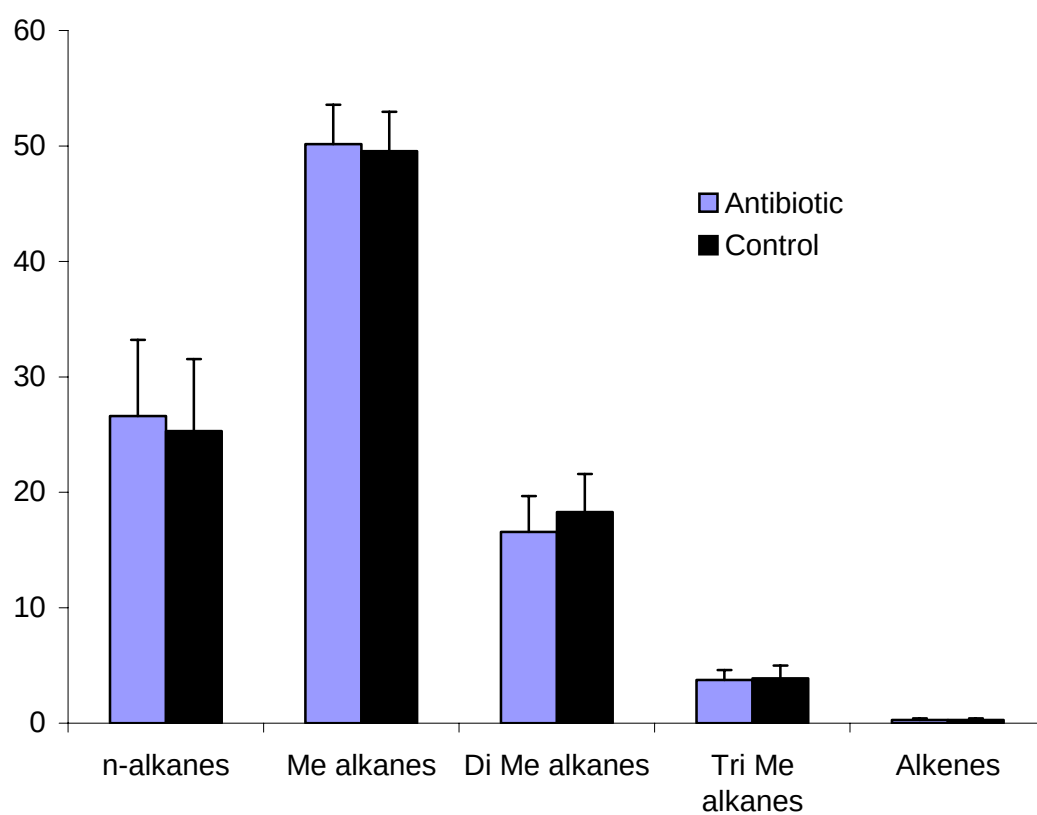


Fig. 1 – Relative quantities of cuticular hydrocarbons in ng on the thorax (mean  $\pm$  SD). All the differences between antibiotic treatment and control were non significant.

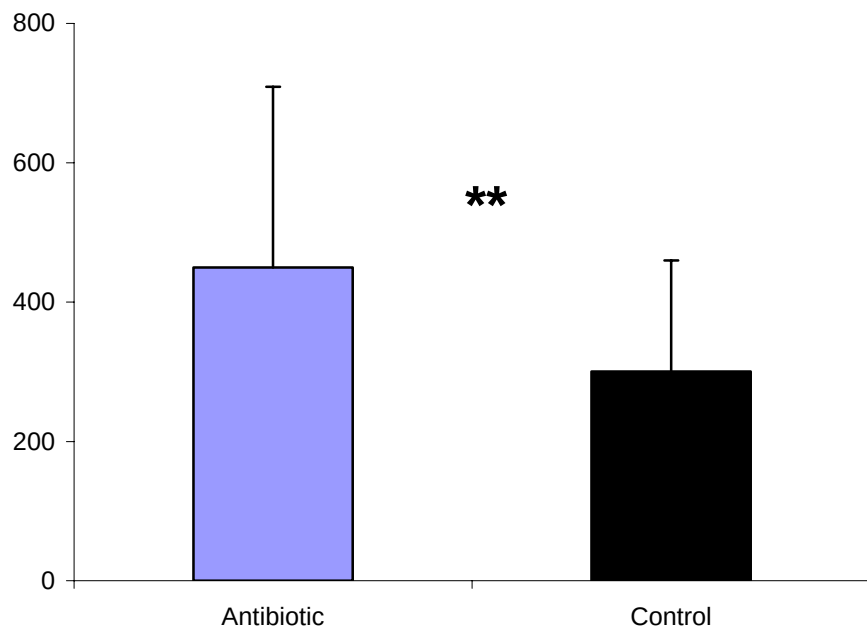


Fig. 2 – Mean quantities of cuticular hydrocarbons on the thorax (ng / ant  $\pm$  SD), Mann-Whitney U test  $P = 0.008$

Table 1 – Cuticular hydrocarbons composition of *Camponotus fellah* thorax of workers. Exp = Experimental treated with antibiotic; C = Control non treated workers. Peak numbers with an asterisk are new ones.

| Peak<br>n° | Name              | Exp (n= 27) |      | C (n= 31) |      |
|------------|-------------------|-------------|------|-----------|------|
|            |                   | Mean        | SD   | Mean      | SD   |
| 1          | C23               | 0,14        | 0,18 | 0,05      | 0,11 |
| 2*         | C24               | 0,03        | 0,07 | 0,00      | 0,00 |
| 3          | C25               | 1,58        | 0,37 | 1,51      | 0,49 |
| 4          | 7C25              | 0,41        | 0,31 | 0,37      | 0,26 |
| 5*         | ester             | 0,54        | 0,19 | 0,67      | 0,16 |
| 6*         | 3C25              | 0,39        | 0,29 | 0,42      | 0,40 |
| 7          | C26               | 0,65        | 0,19 | 0,71      | 0,21 |
| 8*         | 8C26              | 0,08        | 0,17 | 0,04      | 0,09 |
| 9*         | 7C26              | 0,00        | 0,00 | 0,00      | 0,02 |
| 10         | 3C26              | 0,38        | 0,17 | 0,42      | 0,14 |
| 11         | C27               | 14,25       | 3,90 | 14,58     | 4,28 |
| 12         | 11+13C27          | 1,47        | 0,40 | 1,89      | 0,50 |
| 13         | 7C27              | 7,05        | 1,26 | 8,21      | 1,19 |
| 14*        | 5C27              | 0,33        | 0,28 | 0,27      | 0,23 |
| 15*        | ?                 | 0,30        | 0,31 | 0,17      | 0,16 |
| 16         | 3C27              | 25,84       | 2,75 | 24,87     | 2,89 |
| 17         | C28               | 3,11        | 0,79 | 2,71      | 0,81 |
| 18*        | 3,7+3,9C27        | 0,25        | 0,35 | 0,81      | 2,29 |
| 19*        | 10+11+12+13+14C28 | 1,79        | 3,14 | 0,58      | 1,29 |
| 20         | 8C28              | 0,45        | 0,17 | 0,47      | 0,18 |
| 21         | 4C28              | 0,23        | 0,23 | 0,10      | 0,20 |
| 22         | C29:2             | 0,28        | 0,12 | 0,27      | 0,15 |
| 23*        | 3C28              | 0,86        | 0,20 | 0,61      | 0,24 |
| 24         | C29               | 5,41        | 1,80 | 4,53      | 1,29 |
| 25         | 11+13+15C29       | 3,96        | 1,07 | 4,43      | 0,97 |
| 26*        | 7C29              | 0,68        | 0,20 | 0,44      | 0,37 |
| 27*        | ?                 | 0,18        | 0,15 | 0,08      | 0,11 |
| 28*        | 5C29              | 0,96        | 0,29 | 1,03      | 0,39 |
| 29*        | 11,15C29          | 3,42        | 0,85 | 3,59      | 0,93 |
| 30         | 7,15C29           | 1,85        | 0,63 | 1,24      | 0,86 |
| 31*        | 5,9C29            | 0,00        | 0,00 | 0,00      | 0,00 |
| 32*        | TMC29             | 0,38        | 0,25 | 0,42      | 0,28 |
| 33*        | C30               | 0,57        | 0,36 | 0,46      | 0,44 |

|                             |                      |        |      |        |      |
|-----------------------------|----------------------|--------|------|--------|------|
| 34*                         | 12+13+14+15C30       | 0,48   | 0,31 | 0,32   | 0,34 |
| 35*                         | 8C30                 | 0,51   | 0,26 | 0,66   | 0,30 |
| 36*                         | 8,12+8,14C30         | 0,00   | 0,00 | 0,00   | 0,00 |
| 37*                         | 6,14C30              | 0,00   | 0,00 | 0,00   | 0,00 |
| 38                          | C31                  | 0,10   | 0,08 | 0,07   | 0,09 |
| 39                          | 9+11+13+15C31        | 0,41   | 0,23 | 0,29   | 0,18 |
| 40*                         | 11,17+13,17C31       | 2,63   | 0,80 | 3,31   | 0,76 |
| 41*                         | ?                    | 0,68   | 0,19 | 0,88   | 0,20 |
| 42*                         | 7,15C31              | 4,66   | 1,20 | 5,16   | 1,26 |
| 43*                         | ?                    | 0,59   | 0,25 | 0,62   | 0,22 |
| 44                          | 7,15,19C31           | 3,29   | 0,76 | 3,40   | 0,91 |
| 45*                         | C32                  | 0,06   | 0,10 | 0,03   | 0,06 |
| 46*                         | 10+14C32             | 0,19   | 0,12 | 0,16   | 0,13 |
| 47*                         | 10,14C32             | 0,07   | 0,14 | 0,06   | 0,14 |
| 48*                         | 8C32                 | 0,35   | 0,22 | 0,47   | 0,32 |
| 49*                         | 8,12,16TMC32         | 0,06   | 0,09 | 0,05   | 0,08 |
| 50*                         | C33                  | 0,01   | 0,06 | 0,03   | 0,15 |
| 51*                         | 11+13+15C33          | 1,26   | 0,42 | 1,43   | 0,45 |
| 52*                         | 11,19+13,17C33       | 1,05   | 0,33 | 1,32   | 0,35 |
| 53*                         | 7,11+7,15C33         | 1,79   | 0,53 | 2,07   | 0,66 |
| 54*                         | 9,13C33              | 0,55   | 0,34 | 0,60   | 0,28 |
| 55*                         | 7,11,15+7,1,13C33    | 1,95   | 0,67 | 2,03   | 0,62 |
| 56*                         | C34                  | 0,17   | 0,20 | 0,11   | 0,15 |
| 57*                         | 13+15C35             | 0,12   | 0,36 | 0,07   | 0,22 |
| 58*                         | 7C35                 | 0,13   | 0,60 | 0,03   | 0,09 |
| 59*                         | 11,17+13,17+15,17C35 | 0,31   | 0,42 | 0,13   | 0,31 |
| 60*                         | C36                  | 0,52   | 0,38 | 0,51   | 0,50 |
| 61*                         | 13+15C37             | 0,08   | 0,17 | 0,18   | 0,36 |
| 62*                         | 13C39                | 0,13   | 0,21 | 0,05   | 0,13 |
| <b>TOTAL</b>                |                      | 100,00 |      | 100,00 |      |
| <b>Total n-alkanes</b>      |                      | 26,60  | 6,59 | 25,30  | 6,22 |
| <b>Total Me alkanes</b>     |                      | 50,17  | 3,40 | 49,56  | 3,41 |
| <b>Total Di Me Alkanes</b>  |                      | 16,58  | 3,09 | 18,29  | 3,29 |
| <b>Total Tri Me Alkanes</b> |                      | 3,73   | 0,86 | 3,88   | 1,12 |
| <b>Total alkenes</b>        |                      | 0,28   | 0,12 | 0,27   | 0,15 |
| <b>unknown</b>              |                      | 2,63   | 0,69 | 2,69   | 0,49 |

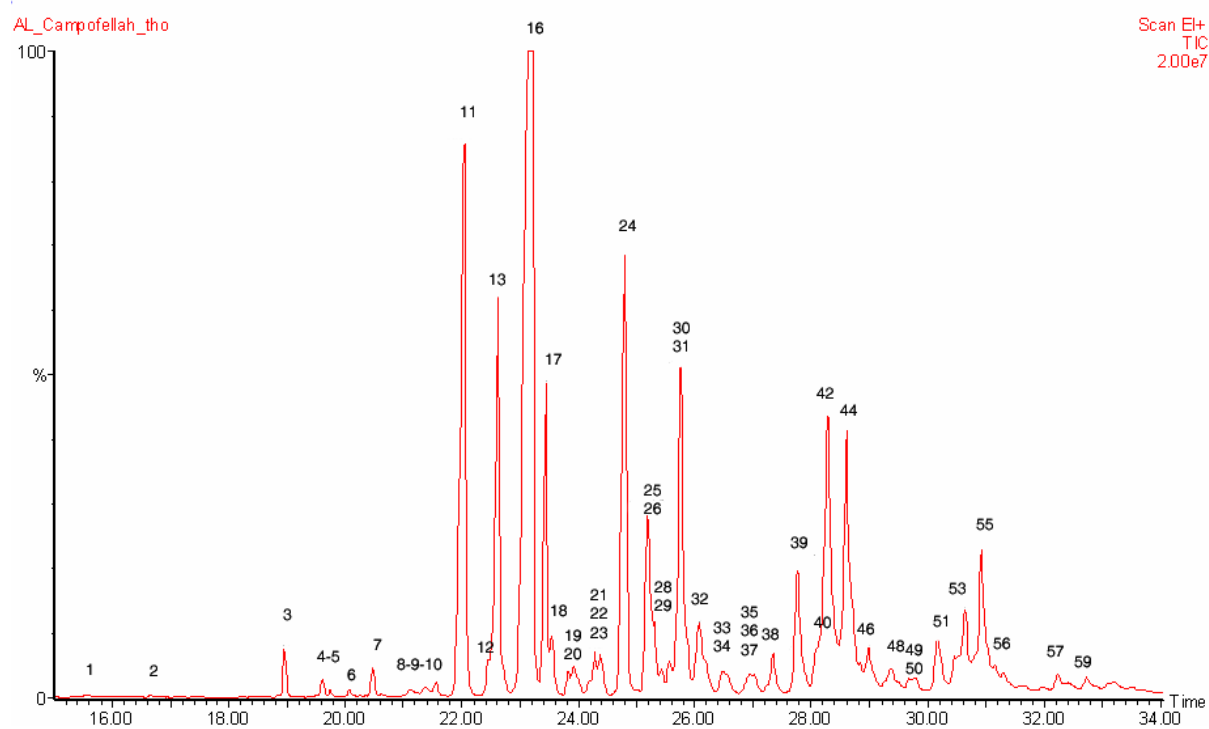


Fig. S1 Chromatogram of cuticular hydrocarbons of *Camponotus fellah* workers. Numbers refer to table 1.



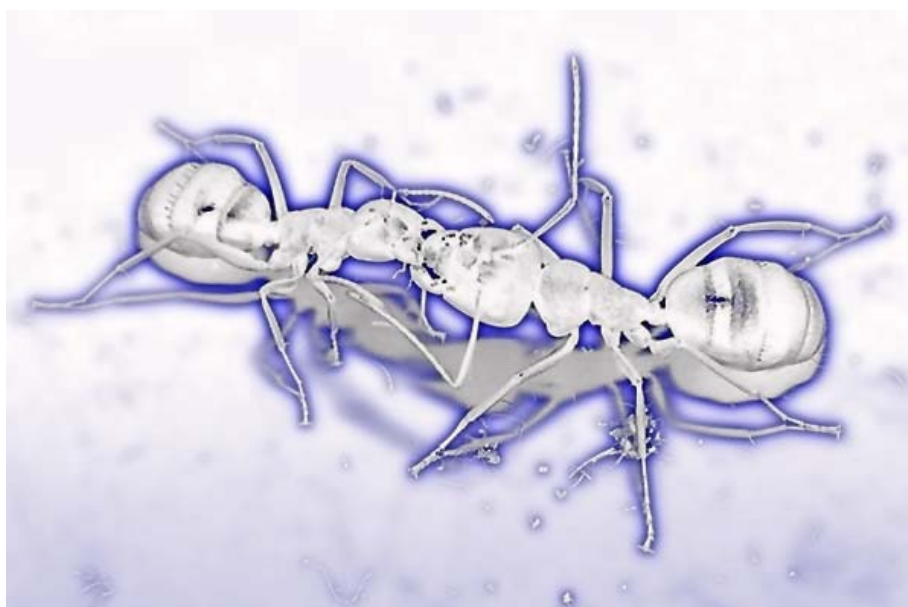
## Conclusion finale

## Conclusion finale

L'homme a toujours eu le monde naturel comme source d'inspiration pour résoudre ses problèmes. Les fourmis sont un bel exemple de haute diversité de stratégies utilisées dans leur « lutte pour la survie ». À la fois, elles mènent des stratégies portées vers la compétition tandis que d'autres sont orientées vers la coopération. Dans ce travail de thèse, nous avons mis en évidence, encore une fois, le rôle de la coopération pour la réussite de ce groupe, coopération entre les congénères au moment où l'une entre elles se trouve infectée. Si ce comportement se montre dangereux pour la colonie (augmentation du taux de transmission de pathogènes), on devrait attendre qu'il soit contre sélectionné.

Même en étant des taxons bien distincts, la fourmi et la bactérie, la fourmi peut tirer d'autres bénéfices de cette association que la nutrition. Il sera intéressant de savoir comment l'hôte peut favoriser (et/ou contrôler) la croissance des bactéries symbiotiques et si les deux (hôte/bactérie) sont capables d'empêcher la croissance de bactéries non symbiotiques. Les techniques de biologie moléculaires nous permettent aujourd'hui la découverte d'un Nouveau Monde d'espèces, cachées longtemps dans leurs hôtes. Chez un groupe tellement diversifié comme celui des fourmis, on espère la découverte d'un autre groupe aussi divers, le monde bactérien, avec ses stratégies et routes biochimiques originales, développées au cours de millions d'années d'évolution biologique et qui peuvent s'avérer utiles à nous finalement.

\*\*\*\*\*



## Bibliographie

- Agosti, D., D. Grimaldi et J.M. Carpenter. 1998. Oldest known ant fossils discovered. *Nature* 391:447.
- Ahtiainen, J.J., R.V. Alatalo, R. Kortet et M.J. Rantala. 2005. A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Journal of Evolutionary Biology* 18:985-991.
- Akman, L., A. Yamashita, H. Watanabe, K. Oshima, T. Shiba, M. Hattori et S. Aksoy. 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics* 32:402-407.
- Alexander, R.D. 1974. The evolution of social behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5:325-383.
- Amann, R.I., L. Krumholz et D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental-studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172:762-770.
- Anselme, C., A. Vallier, S. Balmand, M.-O. Fauvarque et A. Heddi. 2006. Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6766-6772.
- Ataya, H. et A. Lenoir. 1984. Le comportement nécrophorique chez la fourmi *Lasius niger* L. *Insectes Sociaux* 31:20-33.
- Aziz-Alaoui, M.A., et C. Bertelle. 2006. Emergent properties in natural and artificial dynamical systems. 1st edition ed. Springer, Heidelberg.
- Baer, B., S.A.O. Armitage et J.J. Boomsma. 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* 441:872-875.
- Baer, B., A. Krug, J.J. Boomsma et W.O.H. Hughes. 2005. Examination of the immune responses of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. *Insectes Sociaux* 52:298-303.
- Batra, S.W.T. 1966. Nests and social behavior of Halictine bees of India (Hymenoptera: Halictidae). *Indian Journal of Entomology* 28:375-393.
- Baumann, P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* 59:155-189.
- Begon, M., C.R. Townsend et J.L. Harper. 2006. Ecology: from individuals to ecosystems. 4th ed. ed. Wiley-Blackwell.
- Bermingham, J., H. Charles, F. Calevero et T. Wilkinson. 2007. Comparative analysis of gene expression in an aphid-*Buchnera* symbiosis: The role of *Buchnera* in the nutrition of aphid embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology (Abstract)* 146:S222-S222.
- Blochmann, F. 1892. Über das Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten *Zentralblatt für Bakteriologie* 11:234-24.
- Blomquist, G.J. et R.W. Howard. 2003. Pheromone biosynthesis in social insects, pp. 323-340, *In* G. J. Blomquist and R. G. Vogt, (eds.) *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*. Elsevier Academic Press, London
- Blomquist, G.J., J.A. Tillman, S. Mpuu et S.J. Seybold. 1998. The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure, function, and biochemistry, p. 34-54, *In* R. K. Vander Meer, et al., eds. *Pheromone communication in social insects ants, wasps, bees, and termites*. Westview Press, Boulder, Colo.
- Bocher, A., C. Tirard et C. Doums. 2007. Phenotypic plasticity of immune defence linked with foraging activity in the ant *Cataglyphis velox*. *Journal of Evolutionary Biology* 20:2228-2234.

- Bolton, B. 1995a. A taxonomic and zoogeographical census of the extant ant taxa (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Natural History* 29:1037-1056.
- Bolton, B. 1995b. A new general catalogue of the ants of the world Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Boman, H.G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* 254:197-215.
- Bonabeau, E., G. Theraulaz, J.L. Deneubourg, S. Aron et S. Camazine. 1997. Self-organization in social insects. *Trends Ecology and Evolution* 12, 188-193.
- Bordenstein, S.R. et W.S. Reznikoff. 2005. Mobile DNA in obligate intracellular bacteria. *Nature Review Microbiology* 3:688-699.
- Bouchon, D., T. Rigaud et P. Juchault. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265:1081-1090.
- Boulay, R., M. Quagebeur, E.J. Godzinska et A. Lenoir. 1999. Social isolation in ants: Evidence of its impact on survivorship and behavior in *Camponotus fellah* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology* 33:111-124.
- Boulay, R., A. Hefetz, V. Soroker et A. Lenoir. 2000. *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbons exchanges. *Animal Behaviour* 59:1127-1133.
- Brown Jr., W.L. 1968. An hypothesis concerning the function of the metapleural glands in ants. *American Naturalist* 102:188-191.
- Cerenius, L. et K. Soderhall. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198:116-126.
- Chapuisat, M., A. Oppliger, P. Magliano et P. Christe. 2007. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274:2013-2017.
- Choi, Y. S., Y. M. Choo, K. S. Lee, H. J. Yoon, I. Kimm, Y. H. Je, H. Dae Sohn et B. R. Jin. 2008. Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology (in press)*.
- Costa, H.S., T.J. Henneberry et N.C. Toscano. 1997. Effects of antibacterial materials on *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition, growth, survival, and sex ratio. *Journal of Economic Entomology* 90:333-339.
- Cremer, S., S.A.O. Armitage et P. Schmid-Hempel. 2007. Social Immunity. *Current Biology* 17:R693-R702.
- Crozier, R.H., L.S. Jermini, and M. Chiotis. 1997. Molecular evidence for a Jurassic origin of ants. *Naturwissenschaften* 84:22-23.
- Currie, C.R., J.A. Scott, R.C. Summerbell et D. Malloch. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398:701-704.
- Dale, C. et S.C. Welburn. 2001. The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology* 31:628-631.
- Dasch, G.A. 1975. Morphological and molecular studies on intracellular bacterial symbiotes of insects, Ph.D. dissert., Yale University, 346 p.
- Davidson, D.W. et D. McKey. 1993. The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *Journal of Hymenoptera Research* 2:13-83.
- De Souza, D.J., I.M.F. Soares et T.M.C. Della Lucia. 2007. *Acromyrmex ameliae* sp. n. (Hymenoptera : Formicidae): A new social parasite of leaf-cutting ants in Brazil. *Insect Science* 14:251-257.

- Debout, G., B. Schatz, M. Elias et D. McKey. 2007. Polydomy in ants: what we know, what we think we know, and what remains to be done. *Biological Journal of the Linnean Society* 90:319-348.
- Dedine, F., F. Vavre, F. Fleury, B. Loppin, M.E. Hochberg et M. Bouletreau. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:6247-6252.
- Degnan, P.H., A.B. Lazarus et J.J. Wernegreen. 2005. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Research* 15:1023-1033.
- Degnan, P.H., A.B. Lazarus, C.D. Brock et J.J. Wernegreen. 2004. Host-symbiont stability and fast evolutionary rates in an ant-bacterium association: Cospeciation of *Camponotus* species and their endosymbionts, *Candidatus Blochmannia*. *Systematic Biology* 53:95-110.
- Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai et D.A. Relman. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449:811-818.
- Dillon, R.J., C.T. Vennard, A. Buckling et A.K. Charnley. 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters* 8:1291-1298.
- Disney, R.H.L. 1981. *Apocephalus laceyi* n.sp. (Diptera: Phoridae) attacking *Camponotus femoratum* (F.) (Hymenoptera: Formicidae) in Brazil. *Entomologica Scandinavica* 12:31-34.
- Disney, R.H.L. et U. Maschwitz. 2000. Observations on *Megaselia persecutrix* (Diptera: Phoridae) in relation to its host *Camponotus gigas* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 36:585-590.
- Disney, R.H.L. et B.V. Brown. 2003. A new species of *Megaselia* (Diptera : Phoridae) parasitizing a *Camponotus* species (Hymenoptera : Formicidae) in Thailand. *Sociobiology* 41:403-410.
- do Nascimento, R.R., E. Schoeters, E.D. Morgan, J. Billen et D.J. Stradling. 1996. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Chemical Ecology* 22:987-1000.
- Doums, C. et P. Schmid-Hempel. 2000. Immunocompetence in workers of a social insect, *Bombus terrestris* L., in relation to foraging activity and parasitic infection. *Canadian Journal of Zoology* 78:1060-1066.
- Evans, J.D. et D.L. Lopez. 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 97:752-756.
- Evans, J.D., and T.-N. Armstrong. 2006. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology* 6:doi:10.1186/1472-6785-6-4.
- Evans, J.D., K. Aronstein, Y.P. Chen, C. Hetru, J.L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G.J. Thompson, Z. Zou et D. Hultmark. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 15:645-656.
- Feener, J.D.H. 2000. Is the assembly of ant communities mediated by parasitoids? *Oikos* 90:79-88.
- Feldhaar, H., J. Straka, M. Krischke, K. Berthold, S. Stoll, M. Mueller et R. Gross. 2007b. Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMB Biology*:5:48.
- French, S.S., D.F. DeNardo et M.C. Moore. 2007. Trade-offs between the reproductive and immune systems: Facultative responses to resources or obligate responses to reproduction? *American Naturalist* 170:79-89.

- Fytrou, A., P.G. Schofield, A.R. Kraaijeveld et S.F. Hubbard. 2006. *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proceedings of the Royal Society B- Biological Sciences* 273:791-796.
- Gadau, J. et R.H.L. Disney. 1996. The ant host (Hymenoptera: Formicidae) and hitherto unknown female of *Menozziola obscuripes* (Diptera: Phoridae). *Sociobiology* 28:177-181.
- Gaudermann, P., I. Vogl, E. Zientz, F.J. Silva, A. Moya, R. Gross et T. Dandekar. 2006. Analysis of and function predictions for previously conserved hypothetical or putative proteins in *Blochmannia floridanus*. *Bmc Microbiology* 6.
- Gibbs, A.G. 1998. Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist* 38:471-482.
- Gibbs, A.G., A.K. Louie et J.A. Ayala. 1998. Effects of temperature on cuticular lipids and water balance in a desert *Drosophila*: is thermal acclimation beneficial? *The Journal of Experimental Biology* 201:71-80.
- Gil, R., F.J. Silva, E. Zientz, F. Delmotte, F. Gonzalez-Candelas, *et al.* 2003. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:9388-9393.
- Gillespie, J.P., M.R. Kanost et T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42:611-643.
- Gilturnes, M.S., M.E. Hay et W. Fenical. 1989. Symbiotic marine-bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* 246:116-118.
- Grimaldi, D., D. Agosti et J. Carpenter. 1997. New and rediscovered primitive ants (Hymenoptera: Formicidae) in Cretaceous amber from New Jersey, and their phylogenetic relationship. *American Museum Novitates* 3208:1-43.
- Gwynn, D.M., A. Callaghan, J. Gorham, K.F.A. Walters et M.D.E. Fellowes. 2005. Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272:1803-1808.
- Hadley, M. 1972. Perspectives in productivity studies, with special reference to some social insect populations. *Ekologia Polska* 20:173-184.
- Hardie, J. et P. Leckstein. 2007. Antibiotics, primary symbionts and wing polyphenism in three aphid species. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:886-890.
- Heitman, T.L., K.G. Koski et M.E. Scott. 2003. Energy deficiency alters behaviours involved in transmission of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda) in mice. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 81:1767-1773.
- Hölldobler, B. et H. Engel-Siegel. 1985 ("1984"). On the metapleural gland of ants. *Psyche* 91:201-224.
- Hölldobler, B. et E.O. Wilson. 1990. *The ants*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Hopkins, T.L. 1992. Insect cuticle sclerotization. *Annual Review of Entomology* 37:273-302.
- Hotopp, J.C.D., M.E. Clark, D.C.S.G. Oliveira, J.M. Foster, P. Fischer, *et al.* 2007. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317:1753-1756.
- Hughes, W.O., J. Eilenberg et J.J. Boomsma. 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Science* 269:1811-1819.
- Hughes, W.O.H. et J.J. Boomsma. 2004. Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. *Evolution* 58:1251-1260.
- Iwanaga, S. et B.L. Lee. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38:128-150.

- Jeral, J.M., M.D. Breed et B.E. Hibbard. 1997. Thief ants have reduced quantities of cuticular compounds in a ponerine ant, *Ectatomma ruidum*. *Physiological Entomology* 22:207-211.
- Jerome, C.A., D.A. McInnes et E.S. Adams. 1998. Group defense by colony-founding queens in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioral Ecology* 9:301-308.
- Johnson, R.A. et A.G. Gibbs. 2004. Effect of mating stage on water balance, cuticular hydrocarbons and metabolism in the desert harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *Journal of Insect Physiology* 50:943-953.
- Jonkman, J.C.M. 1979. Population dynamics of leaf-cutting ant nests in a Paraguayan pasture *Atta vollenweideri*. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 87:281-193.
- Jouvenaz, D.P. 1986. Diseases of fire ants: Problems and opportunities, p. 327-338, *In* C. S. Lofgren and R. K. Vander Meer, eds. *Fire ants and leaf cutting ants, biology and management*. Westview Press, Boulder, CO.
- Jukes, T.H. et C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132, *In* H. N. Munro, ed. *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York.
- Jutsum, A.R. 1979. Interspecific aggression in leaf-cutting ants. *Animal Behaviour* 27:833-838.
- Jutsum, A.R., T.S. Saunders, and J.M. Cherrett. 1979. Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Animal Behaviour* 27:839-844.
- Kaltenpoth, M., W. Gottler, G. Herzner et E. Strohm. 2005. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology* 15:475-479.
- Karp, R.D. et L.A. Rheins. 1980. Induction of specific humoral immunity to soluble-proteins in the American cockroach (*Periplaneta americana*) .2. Nature of the secondary response. *Developmental and Comparative Immunology* 4:629-639.
- Keller, L. 1993. *Queen number and sociality in insects*. Oxford University Press, Oxford.
- Korner, P., and P. Schmid-Hempel. 2004. In vivo dynamics of an immune response in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Journal of Invertebrate Pathology* 87:59-66.
- Kramm, K.R., D.F. West et P.G. Rockenbach. 1982. Termite Pathogens - Transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp termites. *Journal of Invertebrate Pathology* 40:1-6.
- Krause, J., and G.D. Ruxton. 2002. *Living in groups*. Oxford University Press, New York.
- Lahav, S., V. Soroker, R.K. Vander Meer, and A. Hefetz. 1998. Nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*: do queens matter? *Behavioural Ecology and Sociobiology* 43:203-212.
- Lahav, S., V. Soroker, A. Hefetz et R.K. Vander Meer. 1999. Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* 86:246-249.
- Larsson, K., B. Norén, and G. Odham. 1975a. Antimicrobial effect of simple lipids with different branches at the methyl end group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8:742-750.
- Larsson, K., B. Noren et G. Odham. 1975b. Antimicrobial effect of simple lipids and effect of pH and positive-ions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8:733-736.
- Lavine, M.D., and M.R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:1295-1309
- Lawniczak, M.K.N., A.I. Barnes, J.R. Linklater, J.M. Boone, S. Wigby et T. Chapman. 2007. Mating and immunity in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* 22:48-55.
- Lemaitre, B., and J. Hoffmann. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25:697-743.
- Lemaitre, B., J.M. Reichhart et J.A. Hoffmann. 1997. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of

- microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:14614-14619.
- Lenoir, A., D. Fresneau, C. Errard et A. Hefetz. 1999. Individuality and colonial identity in ants, p. 219-237, *In* C. Detrain, et al., eds. Information processing in social insects. Birkhauser Verlag, Basel.
- Lenoir, A., P. D'Ettorre, C. Errard et A. Hefetz. 2001. Chemical ecology and social parasitism in ants. Annual Review of Entomology 46:573-599.
- Liersch, S. et P. Schmid-Hempel. 1998. Genetic variation within social insect colonies reduces parasite load. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 265:221-225.
- Lockey, K.H. 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. Compared Biochemistry and Physiology 89B:595-645.
- Lombardo, M. 2008. Access to mutualistic endosymbiotic microbes: an underappreciated benefit of group living. Behavioral Ecology and Sociobiology 62:479-497.
- Lorenzi, M.C., M.F. Sledge, P. Laiolo, E. Sturlini et S. Turillazzi. 2004. Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. Journal of Insect Physiology 50:935-941.
- Mallon, E.B., A. Brockmann et P. Schmid-Hempel. 2003. Immune response inhibits associative learning in insects. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 270:2471-2473.
- Mankowski, M.E., and J.J. Morrell. 2003. Incidence of *Apocephalus horridus* in colonies of *Camponotus vicinus* and the effect of antibiotic/antimycotic mixtures on fly emergence (Diptera : Phoridae; Hymenoptera : Formicidae). Sociobiology 42:477-484.
- Margulis, L., et R. Fester. 1991. Symbiosis as a source of evolutionary innovation -speciation and morphogenesis. MIT Press.
- Maschwitz, U. 1974. Vergleichende Untersuchungen zur Funktion der Ameisenmetathorakaldrüse Oecologia 16:303-310
- Maschwitz, U., K. Koob et H. Schildknecht. 1970. Ein Beitrag zur Funktion der Metathoracaldrüse der Ameisen. Journal of Insect Physiology 16:387-404.
- Matsuura, K. 2001. Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, *Reticulitermes speratus*. Oikos 92:20-26.
- Minkley, N., A. Fujita, A. Brune et W.H. Kirchner. 2006. Nest specificity of the bacterial community in termite guts (*Hodotermes mossambicus*). Insectes Sociaux 53:339-344.
- Miorin, P.L., N.C.L. Junior, A.R. Custodio, W.A. Bretz et M.C. Marcucci. 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology 95:913-920.
- Mohrig, W. et B. Messner. 1968. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. Biologisches Zentralblatt 87:439-470.
- Moran, N.A. 2006. Symbiosis. Current Biology 16:R866-R871.
- Moran, N.A. 2007. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:8627-8633.
- Moret, Y. et P. Schmid-Hempel. 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. Science 290:1166-1168.
- Moret, Y. et M.T. Siva-Jothy. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 270:2475-2480.



- Mueller, U.G., S.A. Rehner et T.R. Schultz. 1998. The evolution of agriculture in ants. *Science* 281:2034-2038.
- Murray, R.G.E. et E. Stackebrandt. 1995. Taxonomic Note - Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described prokaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:186-187.
- Nakabachi, A., A. Yamashita, H. Toh, H. Ishikawa, H.E. Dunbar, N.A. Moran et M. Hattori. 2006. The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science* 314:267-.
- Oi, D.H. et R.M. Pereira. 1993. Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera, Formicidae). *Florida Entomologist* 76:63-74.
- Oliver, K.M., J.A. Russell, N.A. Moran et M.S. Hunter. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:1803-1807.
- Ottoni, E.B. 2000. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* 32 446-449.
- Pannebakker, B.A., B. Loppin, C.P.H. Elemans, L. Humblot et F. Vavre. 2007. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:213-215.
- Parisien, A., B. Allain, J. Zhang, R. Mandeville et C.Q. Lan. 2008. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* 104:1-13.
- Passera, L. et S. Aron. 2005. Les fourmis: comportement, organisation sociale et évolution CNRC, Ottawa.
- Pierce, N.E., M.F. Braby, A. Heath, D.J. Lohman, J. Mathew, D.B. Rand et M.A. Travassos. 2002. The ecology and evolution of ant association in the Lycaenidae (Lepidoptera). *Annual Review of Entomology* 47:733-771.
- Pockley, A.G. 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet* 362:469-476.
- Raignier, A. et J.K.A.v. Boven. 1955. Étude taxonomique, biologique et biométrique des *Dorylus* du sous-genre *Anomma* (Hymenoptera Formicidae). *Annales Musée Royal du Congo Belge Nouvelle Série in Quarto Sciences Zoologiques* 2:1-359.
- Rantala, M.J. et R. Kortet. 2003. Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 79:503-510.
- Revis, H.C. et D.A. Waller. 2004. Bactericidal and fungicidal activity of ant chemicals on feather parasites: An evaluation of anting behavior as a method of self-medication in songbirds. *The Auk* 121:1262-1268.
- Rheins, L.A., R.D. Karp et A. Butz. 1980. Induction of Specific Humoral Immunity to soluble-proteins in the american cockroach (*Periplaneta americana*) .1. Nature of the primary response. *Developmental and Comparative Immunology* 4:447-458.
- Richard, F.-J., A. Hefetz, J.-P. Christides et C. Errard. 2004. Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Chemoecology* 14:9-16.
- Richard, F.J., M. Poulsen, A. Hefetz, C. Errard, D.R. Nash et J.J. Boomsma. 2007. The origin of the chemical profiles of fungal symbionts and their significance for nestmate recognition in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61:1637-1649.
- Rousset, F., D. Bouchon, B. Pintureau, P. Juchault et M. Solignac. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 250:91-98.

- Ruan, Y.M., J. Xu et S.S. Liu. 2006. Effects of antibiotics on fitness of the B biotype and a non-B biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121:159-166.
- Salzet, M. 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends in Immunology* 22:285-288.
- Sameshima, S., E. Hasegawa, O. Kitade, N. Minaka et T. Matsumoto. 1999. Phylogenetic comparison of endosymbionts with their host ants based on molecular evidence. *Zoological Science* 16:993-1000.
- Sassera, D., T. Beninati, C. Bandi, E.A.P. Bouman, L. Sacchi, M. Fabbi et N. Lo. 2006. '*Candidatus* Midichloria mitochondrii', an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:2535-2540.
- Sauer, C., E. Stackebrandt, J. Gadau, B. Holldobler et R. Gross. 2000. Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus* Blochmannia gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1877-1886.
- Sauer, C., D. Dudaczek, B. Hölldobler et R. Gross. 2002. Tissue localization of the endosymbiotic bacterium "*Candidatus* Blochmannia floridanus" in adults and larvae of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Applied Environmental Microbiology* 68:4187-4193.
- Schmid-Hempel, P. 1995. Parasites and social insects. *Apidologie* 26: 255-271.
- Schmid-Hempel, P. 1998. Parasites in social insects. Princeton University Press, Princeton.
- Schmid-Hempel, P. et R.H. Crozier. 1999. Polyandry versus polygyny versus parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354:507-515.
- Schmid-Hempel, P., and D. Ebert. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology & Evolution* 18:27-32.
- Schroder, D., H. Deppisch, M. Obermayer, G. Krohne, E. Stackebrandt, B. Holldobler, W. Goebel et R. Gross. 1996. Intracellular endosymbiotic: Bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): Systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Molecular Microbiology* 21:479-489.
- Singer, T.L. et K.E. Espelie. 1998. Nest and nestmate recognition by a fungus-growing ant, *Apterostigma collare* Emery (Hymenoptera: Formicidae). *Ethology* 104:929-939.
- Sokal, R.R. et F.J. Rohlf. 1995. Biometry, Third Edition. Freeman and Co, New York.
- Stewarttull, D.E.S. 1980. The immunological activities of bacterial peptidoglycans. *Annual Review of Microbiology* 34:311-340.
- Stouthamer, R., J.A.J. Breeuwer et G.D.D. Hurst. 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* 53:71-102.
- Stow, A., D. Briscoe, M. Gillings, M. Holley, S. Smith, R. Leys, T. Silberbauer, C. Turnbull et A. Beattie. 2007. Antimicrobial defences increase with sociality in bees. *Biology Letters* 3:422-424.
- Sumner, S., W.O.H. Hughes et J.J. Boomsma. 2003. Evidence for differential selection and potential adaptive evolution in the worker caste of an inquiline social parasite. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 54:256-263.
- Taguchi, S., P. Bulet et J.A. Hoffmann. 1998. A novel insect defensin from the ant *Formica rufa*. *Biochimie* 80:343-346.
- Tamames, J., R. Gil, A. Latorre, J. Pereto, F.J. Silva et A. Moya. 2007. The frontier between cell and organelle: genome analysis of *Candidatus* Carsonella ruddii. *Bmc Evolutionary Biology* 7.

- Traniello, J.F.A., R.B. Rosengaus et K. Savoie. 2002. The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:6838-6842.
- Tzou, P., S. Ohresser, D. Ferrandon, M. Capovilla, J.M. Reichhart, B. Lemaitre, J.A. Hoffmann et J.L. Imler. 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13:737-748.
- Ugelvig, L.V. et S. Cremer. 2007. Social Prophylaxis: Group interaction promotes collective immunity in ant colonies. *Current Biology* 17:1967-1971.
- Vander Meer, R.K. et L. Morel. 1998. Nestmate recognition in ants, p. 79-103, *In* R. K. Vander Meer, et al., eds. *Pheromone communication in social insects*. Westview Press, Boulder, CO. 368 p.
- Vautrin, E., S. Genieys, S. Charles et F. Vavre. 2008. Do vertically transmitted symbionts co-existing in a single host compete or cooperate? A modelling approach. *Journal of Evolutionary Biology* 21:145-161.
- Viana, A.M.M., A. Frezard, C. Malosse, T.M.C. Della Lucia, C. Errard et A. Lenoir. 2001. Colonial recognition of fungus in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera : Formicidae). *Chemoecology* 11:29-36.
- Viljakainen, L. et P. Pamilo. 2005. Identification and molecular characterization of defensin gene from the ant *Formica aquilonia*. *Insect Molecular Biology* 14:335-338.
- Wagner, D., M.J.F. Brown, P. Broun, W. Cuevas, L.E. Moses, D.L. Chao et D.M. Gordon. 1998. Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *Journal of Chemical Ecology* 24:2021-2037.
- Wagner, D., M. Tissot, W. Cuevas et D.M. Gordon. 2000. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology* 26:2245-2257.
- Wang, Q., G.M. Garrity, J.M. Tiedje et J.R. Cole. 2007. Naïve bayesian classifier for Rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5261-5267.
- Weinstock, G.M., G.E. Robinson, R.A. Gibbs, K.C. Worley, J.D. Evans *et al.* 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443:931-949.
- Wenseleers, T., F. Ito, S. van Borm, R. Huybrechts, F. Volckaert et J. Billen. 1998. Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 265:1447-1452.
- Wernegreen, J.J. 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics* 3:850-861.
- Wernegreen, J.J., A.B. Lazarus et P.H. Degnan. 2002. Small genome of *Candidatus* Blochmannia, the bacterial endosymbiont of *Camponotus*, implies irreversible specialization to an intracellular lifestyle. *Microbiology-Sgm* 148:2551-2556.
- Wernegreen, J.J., P.H. Degnan, A.B. Lazarus, C. Palacios et S.R. Bordenstein. 2003. Genome evolution in an insect cell: Distinct features of an ant-bacterial partnership. *Biological Bulletin* 204:221-231.
- Wilson, E.O. 1971. *The insect societies* Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Wilson, K., R. Knell, M. Boots et J. Koch-Osborne. 2003. Group living and investment in immune defence: an interspecific analysis. *Journal of Animal Ecology* 72:133-143.
- Wolschin, F., B. Holldobler, R. Gross et E. Zientz. 2004. Replication of the endosymbiotic bacterium *Blochmannia floridanus* is correlated with the developmental and reproductive stages of its ant host. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4096-4102.
- Wu, D., S.C. Daugherty, S.E. Van Aken, G.H. Pai, K.L. Watkins, H. Khouri, L.J. Tallon, J.M. Zaborsky, H.E. Dunbar, P.L. Tran, N.A. Moran et J.A. Eisen. 2006. Metabolic

- complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. PLoS Biology 4:e188.
- Zientz, E., T. Dandekar et R. Gross. 2004. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68:745-+.
- Zientz, E., H. Feldhaar, S. Stoll et R. Gross. 2005. Insights into the microbial world associated with ants. Archives of Microbiology 184:199-206.
- Zientz, E., N. Beyaert, R. Gross et H. Feldhaar. 2006. Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. Applied and Environmental Microbiology 72:6027-6033.

## Résumé

La vie en société présente des avantages écologiques et évolutifs, mais augmente les risques de transmission de pathogènes. Pour faire face à ce problème, les insectes sociaux ont développé plusieurs mécanismes de défenses comportementales et physiologiques, et en plus utilisé la protection fournie par des organismes tiers. C'est ainsi que des abeilles et des fourmis se servent de substances antimicrobiennes d'origine végétale ou des fourmis possèdent des bactéries productrices d'antibiotiques. La fourmi est un insecte qui, par définition, ne peut vivre que dans sa société avec des congénères avec lesquels elle entretient des relations nombreuses comme des léchages interindividuels et des échanges en bouche à bouche (appelés trophallaxies). Dans la première partie de la thèse, nous avons étudié les altérations comportementales des ouvrières de la fourmi *Camponotus fellah* après le déclenchement d'une réaction immunitaire. Nous avons posé l'hypothèse que si les relations sociales sont aussi coûteuses que les défenses immunitaires physiologiques, l'individu devrait être confronté à un choix : où investir son énergie ? Au contraire, suite à une réaction immunitaire les fourmis ont augmenté leur taux de trophallaxie et aucun signe d'isolement de l'ouvrière malade ne fut observé. Ce résultat met en évidence l'importance des relations sociales pour la guérison de l'individu et qui peuvent même avoir une fonction prophylactique. La deuxième partie a été consacrée à l'étude d'un endosymbiote primaire de *C. fellah*, une bactérie du genre *Blochmannia*. Cet endosymbiote a un rôle nutritif qui a été déjà montré chez d'autres espèces de *Camponotus*. Nous avons envisagé qu'il ait aussi d'autres fonctions comme : favoriser le système immunitaire de la fourmi, favoriser le développement des nouvelles colonies et participer à la formation d'odeur coloniale. Nous avons d'abord décrit cette nouvelle bactérie par des techniques de biologie moléculaire. Ensuite, nous avons pu montrer qu'elle favorise la réponse immunitaire des fourmis en augmentant l'encapsulation de particules étrangères. Elle contribue à une plus grande production de larves, aboutissant à une plus grande quantité d'ouvrières. Nous n'avons pas mis en évidence de lien entre la quantité de bactéries et celle d'hydrocarbures cuticulaires, bien que leur élimination par un antibiotique entraînait une surproduction de ces hydrocarbures, probablement une réponse liée au stress. Plus généralement, ces travaux montrent de nouvelles fonctions des endosymbiotes, qui ont probablement contribué au succès écologique de ce groupe de fourmis hautement diversifié et très répandu.

## Abstract

The colonial lifestyle has ecological and evolutionary advantages, but it increases the risks of pathogen transmission. To minimize this problem, social insects have developed several behavioural and physiological defence mechanisms, including using protection provided by other organisms. Bees and ants utilize antimicrobial substances of vegetable origin and ants harbour antibiotics-producing bacteria to control parasites. Ants are insects that cannot live without their nestmates with which they maintain many interactions, such as grooming and trophallaxis. In the first part of this thesis, we studied the behavioural alterations in workers of the ant *Camponotus fellah* after mounting an immune response. We hypothesized that if social interactions and physiological immune responses are expensive, individual workers should be forced to choose where to invest energy. In fact, after mounting an immune response, the workers increased their trophallaxis rate and no sign of avoidance by nestmates was observed. This result highlights the importance of social relations for individual cure and prophylactic mechanisms. In the second part, we studied the primary endosymbiont of *C. fellah*, a bacterium of *Blochmannia* genus. This bacterium plays a role in ant nutrition, a function already demonstrated in other *Camponotus* species. We considered the possibility that the importance of this association is not exclusively nutritional. The bacterium might improve the host immune system and increase the development rate of incipient colonies. Indeed, it might be involved in colony odour formation. The first step was to describe formally this new bacterium with molecular biology techniques. Next, we showed that it improves the host immune response by increasing the encapsulation rate against foreign particles. It increases host larvae production and the number of adult workers. Though we did not find a relation between the number of bacteria and the amount of cuticular hydrocarbons, when the bacteria was eliminated with antibiotics, cuticular hydrocarbons were overproduced, which could be interpreted as a stress response. This work highlights new functions of *Blochmannia* endosymbionts in their association with the ants. The bacterium likely contributed to the ecological success of *Camponotus* ants, a globally widespread genus.