



UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS - TOURS

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2005-2006



THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOURS

Discipline : Sciences de la Vie
présentée et soutenue publiquement

par :

Jean-Christophe Lenoir

le 22 Juin 2006

Structure sociale et stratégie de reproduction chez *Cardiocondyla elegans*

Directeur de thèse : Pr. **Alain Lenoir**

Co-encadrant de thèse : Dr. **Jean-Luc Mercier**

JURY :

Mr. Michel Chapuisat , Maître-assistant, Chargé de cours. Université de Lausanne (Suisse).	Rapporteur
Mr. Dominique Fresneau , Professeur. Université de Paris XIII.	Rapporteur
Mr. Jürgen Heinze , Professeur. Université de Regensburg (Allemagne).	Examineur
Mr. Alain Lenoir , Professeur. Université de Tours.	Directeur de thèse
Mr. Jean-Luc Mercier , Maître de Conférences. Université de Tours.	Co-encadrant de thèse
Mr. Robert J. Paxton , Lecturer in genetics. Queen's University of Belfast (Irlande).	Examineur

Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte

UMR CNRS 6035

Université de Tours
Faculté des Sciences et Techniques
Parc de Grandmont
Avenue Monge
37200 Tours
France

Cette thèse qui s'achève est l'occasion pour moi de remercier toutes celles et ceux qui m'ont permis qu'elle se réalise. Cette section est peut-être la plus difficile à écrire, mais avec la table des matières, elle est sûrement la plus lue de chaque thèse. Mes talents littéraires sont assez limités mais je vais essayer de faire au mieux et que toutes les personnes qui me liront sachent que l'intention est là et que ces remerciements sont sincères.

Je tiens, tout d'abord, à remercier **Monsieur le président** et **Messieurs les membres du jury** pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes remerciements à la **Région Centre** pour avoir financé ce travail de thèse.

J'adresse mes remerciements à **Jérôme Casas** pour son accueil au sein de l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte.

J'aimerais remercier **Jean-Luc Mercier** et **Alain Lenoir** pour m'avoir fait confiance, m'avoir confié ce sujet de thèse et avoir encadré mon travail. Ils ont su orienter mes recherches aux bons moments tout en me laissant une grande autonomie. Ils ont toujours été motivés et enthousiastes dans les différentes étapes de ce travail et m'ont également fourni le support scientifique et technique nécessaire.

Je remercie aussi les autres membres de l'équipe : **Christine Errard**, **Danival de Souza** ainsi que **Freddie-Jeanne Richard** pour leur soutien et leur aide.

Je remercie **Stéphane Rodrigues** pour sa curiosité, pour m'avoir guidé dans la partie « géologie » et pour m'avoir fait découvrir que même les sédiments peuvent s'exprimer, surtout en Loire. Je remercie également toute l'équipe du GÉEAC pour leur accueil et leur bonne humeur malgré le fait que je ne venais que pour leur casser les oreilles avec la ROTAP.

Je remercie **Philippe Jugé**, tout d'abord pour avoir apporté un support technique de très haute qualité, mais également et surtout pour sa disponibilité et son enthousiasme sans limite. Merci de m'avoir tellement appris, depuis bien avant que cette thèse ne débute, de la plongée sous-marine au maniement de la technologie GPS de haute précision en passant par le kayak et le bâton du diable !

J'aimerais remercier tout le **Personnel de la Maison de la Loire** et plus particulièrement **Thierry Poli**, **Eric Beaugendre**, **Guillaume Romani** et **Fabienne Barbault**, pour leur travail de sensibilisation et d'éducation à l'environnement auprès d'un très large public. Je trouve leur mission indispensable et ils la remplissent avec efficacité et passion. Ils m'ont également apporté un soutien logistique appréciable et m'ont promu au rang honorifique de « Monsieur des Fourmis » auprès de nombreux écoliers de la région. Pour tout cela merci.

Merci également aux **membres du Conservatoire du Patrimoine de la Région Centre (C.P.N.R.C.)** qui s'affairent à la sauvegarde des milieux naturels les plus remarquables pour leur faune, leur flore, leur qualité paysagère ou géologique. J'ai eu, grâce à eux, une totale liberté de travail sur les zones où l'on trouve *Cardiocondyla elegans*. J'espère qu'en retour mon travail apportera des éléments qui faciliteront leur tâche.

Mon laboratoire d'accueil est l'IRBI, mais c'est le Département des Sciences du Comportement (DESCO) qui a supporté les humeurs du groupe fourmis jusqu'à très récemment. Pour leur patience, leur bonne humeur et leur disponibilité j'aimerais remercier **Dominique Le Glaunec**, **Anne-Marie le Guisquet**, **Séverine Devers**, **Georges Roseau**, ce fut très agréable de travailler parmi vous.

J'aimerais remercier **Raymond Jégat** qui a toujours su répondre efficacement à mes sollicitations techniques. Il a su par son ingéniosité faciliter ma vie de chercheur de terrain (je pense particulièrement aux nombreux aspirateurs de terrain qui mériteraient d'être nommés MiniRJ et MaxiRJ) et de laboratoire (je pense ici aux nombreux nids artificiels mais surtout à une réalisation dont le projet pouvait paraître difficile : pouvoir peser 50 kg de sable au gramme près avec moins de 150 euros, pour calibrer les sondes de terrain ; ce fut chose faite grâce à la réalisation d'une balance romaine de précision).

Je remercie l'équipe Ecologie chimique, moléculaire et Insectes sociaux et **Anne-Geneviève Bagnères** pour m'avoir permis de faire les premières extractions d'ADN sur *C. elegans* et le criblage des microsatellites sur cette espèce. Je remercie particulièrement **Simon Dupont**, camarade de formation, qui m'a guidé à la paillasse, **Madgalena Kutnik** et **Stéphanie Dronnet** qui m'ont guidé de façon plus théorique dans la lecture et l'analyse des données.

Merci à **Jean-Philippe Christides** qui a, de nombreuses fois, travaillé pour moi, que ce soit dans la gestion du plateau de chimie ou pour l'analyse informatique de données comportementales. Ses conseils et ses

connaissances ont souvent été essentielles dans l'avancement de mes travaux. En plus c'est un motard... du dimanche par jour ensoleillé... mais sympa !

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire de Biologie I de Regensburg pour leur accueil durant mes deux séjours chez eux. Ce fut un plaisir de travailler dans leur laboratoire, pour son accessibilité et la rigueur qui y existe mais également pour la disponibilité et les compétences de tous ceux qui en font partie. Je remercie ici plus particulièrement **Alexandra Schrempp** et **Jürgen Heinze** pour m'avoir soutenu et guidé dans toutes les étapes du travail de génétique, **Tina Wanke** et **Andreas Trindl** pour leur soutien technique durant ce même travail.

Je remercie **Nicolas Châline** pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux et pour nos longues discussions scientifiques, j'espère que l'on aura encore beaucoup à travailler ensemble. Merci également aux anciens de Bures, particulièrement à **David Laloi** et **François-Xavier Dechaume Moncharmont** qui se sont battus pour que le travail que nous avions entrepris lorsque j'étais en DESS soit publié, merci à vous deux pour votre travail et votre efficacité, progresser grâce à vos conseils fut un plaisir. Je n'oublie pas **Antoine Chaffiol** qui sait toujours, par son grain de folie artistique, me détendre dans les moments de stress. Merci également à **Axel Decourtye** et **Nicolas Desneux**.

Je remercie **Olivier Dangles** pour son énorme travail dans l'analyse et l'écriture du second article de cette thèse. Lui aussi m'impressionne par son efficacité et sa vivacité d'esprit. J'espère pouvoir prétendre à autant de compétences un jour.

Merci à M^{lle} **Laëtitia Guilbert** qui fut ma première (et la meilleure) stagiaire durant son Master I. Elle a su en très peu de temps bâtir un travail tout à fait remarquable. Dommage que tu aies choisi une autre voie, je pense que la recherche y perd.

Je remercie **Éric Darrouzet** qui nous a amené ses connaissances en physiologie de la reproduction et qui nous a aidé à adapter ses techniques à *C. elegans*.

J'aimerais remercier **Patrizia D'Ettorre**, **Andrew Bourke**, **Abraham Hefetz** et **Xim Cerdà** qui ont accepté de relire et de donner leurs points de vue sur différents articles de ce travail. Ces derniers ont permis de les rendre plus consistants.

Merci à **Pierre-Yves Sizaret** qui nous a assisté dans la prise de vue en microscopie électronique à balayage mais m'a également accompagné dans l'enseignement de TP à l'IUT de Tours.

J'ai une pensée émue pour **Christian Thibeaudeau** (décédé le 3 mai 2005), qui m'a également guidé pour le MEB tout d'abord lors de ma Maîtrise puis en Thèse.

Je remercie également **Guy** et **Anne-Marie Le Roux** qui m'ont donné ma première chance en tant que chercheur et légué connaissances et matériel.

Je voudrais remercier **Hannah Reynolds**, qui a relu l'anglais de la plupart de mes manuscrits et a toujours su trouver la bonne tournure.

Je pense également aux autres thésards, ex-thésards, ATER, MdC etc... qui m'accompagnent ou m'ont accompagné quotidiennement : **Cecile Ducottet**, **Aurore Dubuffet**, **Laurianne Leniaud**, **Bertille Provost**, **Sandrine Lacoume**, **Appoline Pichon**, **Karine Poitrineau**, **Sylvain Pincebourde**, **Franck Dedeine**, **Arnold Fertin**, **Thomas Steinmann**, **Bruno Jaloux**.

J'aimerais tout particulièrement remercier **Arnaud Aubert** qui a, par ses connaissances, son sens de l'analyse et son esprit de synthèse, participé et orienté de nombreux travaux de cette thèse. Il m'a également beaucoup aidé dans l'élaboration de dossiers en tout genre avec une efficacité déconcertante et est de façon plus générale de très bon conseil. Merci pour avoir pris le temps d'écouter et de parler avec un fourmicologue.

Merci à **Julien Renault**, qui bien qu'ayant changé son fusil d'épaule (des fourmis aux souris), reste un très bon partenaire, que ce soit pour des discussions scientifiques ou plus personnelles.

Merci également à **Samuel Leman** qui m'apporte également beaucoup lors de nos longues discussions, merci surtout pour ta joie de vivre et ton optimisme à toute épreuve.

Merci à vous trois pour avoir été de très bons camarades de jeu.

Je terminerai ces remerciements par les trois personnes qui me sont les plus chères : **mes parents** et **Charlotte**. Vous dédier cette thèse est bien peu de choses en regard de ce que vous m'apportez.

Cette liste de remerciement peut paraître un peu longue mais elle est à l'image de ce que pour moi représente le travail de recherche scientifique : multidisciplinaire. Je pense que les recherches les plus efficaces sont celles qui réunissent le maximum de compétences **différentes** autour d'un dénominateur commun. Je suis très heureux et fier que l'on m'ait permis de bâtir ce travail dans ce sens et j'espère pouvoir continuer dans cette voie.

Résumé

Cardiocondyla elegans est une fourmi méditerranéenne que l'on retrouve sur les bords de Loire. Cette espèce possède quelques particularités, comme par exemple avoir des mâles aptères. Les objectifs de cette thèse étaient de comprendre sa biologie, ses stratégies de reproduction ainsi que les caractéristiques de son environnement. Pour cela, nous avons utilisé une **approche multidisciplinaire**, menant des études de pédologie, d'écologie et de botanique (caractérisation de l'habitat et de l'environnement), ainsi que de génétique et d'éthologie (structure génétique des nids et des populations, détermination du génotype et comportement des sexués).

Après avoir confirmé génétiquement la **monogynie** de cette espèce (une seule reine entourée d'environ 200 ouvrières), nous nous sommes attachés à analyser l'habitat de *C. elegans*. Le nid est creusé dans le sol jusqu'à 40 cm de profondeur. Il est composé, comme celui de nombreuses autres espèces, d'un conduit vertical reliant une dizaine de chambres superposées. En milieu ligérien, *C. elegans* se retrouve uniquement sur les grèves en voie de fixation. Nous avons montré que la **composition des sédiments de ces grèves était importante pour la survie de cette fourmi**. Durant l'été, elle permet dans les chambres les plus profondes, de conserver une température constante inférieure à 30°C avec de très faibles variations quotidiennes. Durant les crues, les sédiments composés de moins de 60% de sable, ne sont que très peu entraînés par le courant (grèves « fixées »). De plus ils permettent, lors de la remontée de la nappe alluviale, la création de poches d'air nécessaires à la survie des fourmis.

L'étude de la répartition spatiale des nids au cours des années nous a révélé que **40% des nids disparaissent d'une année sur l'autre suite aux conditions hivernales**. Cependant, suffisamment d'individus sexués, en l'occurrence des femelles fécondées, survivent pour fonder de nouveaux nids. La population étudiée de *C. elegans* sur les bords de Loire montre une forte densité avoisinant 1 nid/m². Les grèves fixées étant des environnements morcelés, les nids entrent en **compétition pour l'espace** et se distribuent de façon régulière. Ainsi, moins de 1% des femelles réussissent à fonder de nouveaux nids.

De Juillet à Septembre, les nids matures produisent des individus sexués. Alors que les femelles sont ailées, *C. elegans* possède une particularité par rapport aux autres fourmis : elle ne produit que des **mâles ergatoïdes** (sans ailes) tolérants entre eux. Nous avons déterminé que lors de la période de reproduction, les nids contenaient en moyenne 5,3 mâles ergatoïdes et 76,6 femelles ailées. La reine est généralement fécondée par plusieurs mâles. Ainsi les

individus du nid sont issus de la même mère mais peuvent avoir des pères différents (en moyenne 4,5 **fratries** par nid).

En analysant la structure génétique des populations nous pouvons dire que 30% des accouplements impliquent des individus non apparentés. Ce fait est dû à la présence de nombreux **sexués étrangers** à l'intérieur des nids. La présence d'individus étrangers dans des colonies monogynes est singulière et nous a amené à nous interroger sur les stratégies de reproduction de *C. elegans*. Des tests comportementaux nous ont permis de mettre en évidence que les mâles étaient toujours acceptés lorsqu'ils tentaient de pénétrer dans une nouvelle colonie, contrairement aux femelles ailées qui sont systématiquement attaquées. La présence de femelles ailées dans des nids étrangers est liée à leur **transport par des ouvrières**, un comportement que nous avons observé sur le terrain en période de reproduction. Ces échanges de sexués pourraient permettre de diminuer la consanguinité à l'intérieur de la population, évitant ainsi la production de mâles diploïdes (stériles) et procurer une meilleure résistance de la population en cas de changements environnementaux.

L'étude de cette fourmi nous a permis de mettre en évidence une **stratégie de reproduction originale**, décrite ici pour la première fois. Notre étude révèle également que *C. elegans* est la seule espèce de fourmis à être adaptée aux conditions environnementales des grèves en fixation. La seule présence de cet organisme, au même titre que certaines espèces végétales, permet de **caractériser une étape de l'évolution morphologique des chenaux secondaires de la Loire**.

Mots-clés : Fourmis ; *Cardiocondyla* ; espace ligérien ; inondations ; espèce pionnière ; bio-indicateur ; distribution spatiale ; stratégie de reproduction ; mâles ergatoïdes ; copulations multiples et intranidales ; adoption de sexués.

Social structure and reproductive strategies of *Cardiocondyla elegans*

Summary

Cardiocondyla elegans is a Mediterranean ant that is present in the Loire River sides. The aims of this thesis were to have a better understanding of its biology, reproductive strategies as well as the characteristics of its environment. We then used an **integrated framework**: pedology, ecology and botanic for the habitat and environment characterization, genetic and ethology to determine the genetic structure of nests and populations and to investigate behaviour of sexual individuals.

C. elegans nests consist of a 40 cm deep vertical pipe connecting a dozen of chambers. In Loire River habitats, *C. elegans* was found only in stable alluvial deposits. **The composition of these sediments are from importance for the survival of the nests.** They provide constant temperature in the deepest chambers; even in the hottest period of the summer, temperature remains less than 30°C with few daily variations. As the sediments containing less than 60% fine sand, the habitat can resist to floods and these rises in the watertable can retain an air pocket needed for ants to survive.

Our study on spatial distribution of colonies along two successive years reveals that **40% of them disappear because of the winter conditions.** Nonetheless, numerous winged females survive and found new nests. *C. elegans* generally attains a density of 1 nest per m² in Loire riverine habitat during the summer. As this ant lives in a patchy environment, **colonies compete for space**, and we found that they finally distribute regularly. Intra-specific competition is probably one of the reasons why less than 1% of the new queen success in nest foundation.

From July to September, mature nests produce sexual individuals. *C. elegans* develop regular winged female and more peculiar wingless ergatoid males. Contrary to other ergatoid males in *Cardiocondyla* genus, males of *C. elegans* are mutually tolerant. We confirmed **monogyny** for this species with one queen and about 200 workers per nest. The mean numbers of ergatoid males and winged females during the reproductive period are respectively 5.3 and 76.6. Usually, the mother queen was mated by several males. Individuals of the same nest came from about 4.5 different **patriline**s. Analysis of the population genetic structure indicates that 30% of the copulations involve unrelated partners. We also founded numerous **alien sexuals** inside the nests. Foreign sexuals inside nests of a monogynous ant

species is puzzling and ask questions on the reproductive strategies of *C. elegans*. In behavioural tests of adoption, host workers always accept ergatoid males to enter their nest whereas they repel and attack winged females. The presence of alien winged females inside nests can be explained by the active carrying behaviour of some workers in the field. These **workers carry winged females** from a nest to another one and host workers do not develop aggressive behaviour in these conditions. Exchanges of sexual individuals can reduce inbreeding depression in the population and then avoid diploid males' problems. That also provides more genetic variability to resist in case of major environmental changes.

Then, our study show an **original reproductive strategy** for *C. elegans*, describes here for the first time. We also show that *C. elegans* is the only ant species adapted to early stages of stabilization of the alluvial deposits. Thus, along with the local flora, *C. elegans* can be used as an indicator to **characterize the morphological evolution of the secondary channels of the Loire River**.

Keywords: Ants; *Cardiocondyla*; Loire River environment; flooding; pioneer species; bio-indicator; spatial distribution; reproductive strategy; monogyny; ergatoid males; multiple and intranidal copulations; adoption of sexual individuals.

Table des matières

Introduction.....	1
Cadre écologique de l'étude : la Loire.....	1
Espèces bio-indicatrices et/ou invasives.....	4
Stratégies de reproduction chez les Hyménoptères sociaux.....	5
La sélection sexuelle.....	6
Stratégies de reproduction des femelles.....	8
Sexe ratio	10
Rencontre des sexes et copulations.....	11
Le genre <i>Cardiocondyla</i>	12
<i>Cardiocondyla elegans</i>	14
Objectifs et plan général de la recherche.....	19
Biologie et écologie.....	21
Article 1. Structure des nids de <i>Cardiocondyla elegans</i> : comment résister à la noyade et aux fortes températures ?	21
Abstract.....	23
Introduction.....	24
Methods.....	25
Results.....	27
Discussion	30
Acknowledgments	32
Tables.....	33
Figure Captions	34
References	41
Distribution spatiale et survie de <i>C. elegans</i>	45
Article 2. Influence de la crue sur l'établissement, la mortalité et la répartition spatiale des nids.	45
Abstract.....	47
Introduction.....	48
Material and methods	49
Results.....	51
Discussion	53
Acknowledgments	55
References	55
Figure list	58

Structure génétique des nids et des populations.....	68
Article 3. Développement de marqueurs microsatellites pour l'étude de la fourmi <i>Cardiocondyla elegans</i>	68
Article 4. Structure génétique et stratégie de reproduction de <i>Cardiocondyla elegans</i> : quand des nids monogynes sont envahis par des sexués étrangers	71
Abstract.....	74
Introduction	75
Materials and Methods	76
Results	80
Discussion	82
References	85
Acknowledgments	88
Figure Legends.....	89
Tables and Figures	90
Discussion	95
Structure sociale	95
Environnement, survie et distribution spatiale.....	95
Stratégie de reproduction.....	96
Structure génétique	96
Sexe ratio	97
Compétition locale pour l'accès aux femelles (Local Mate Competition) – tolérance entre mâles	98
Espèce invasive et/ou bio-indicatrice des grèves du fleuve Loire ?	100
Conclusion	103
Perspectives	104
Références bibliographiques	106

Introduction

Cette thèse porte sur l'étude d'une fourmi des bords de Loire. Nous verrons tout d'abord dans quel contexte environnemental s'inscrit notre sujet d'étude. Nous chercherons ensuite à voir comment peut être caractérisé ce type d'espèce par rapport à son environnement. Enfin nous verrons quelles sont les différentes stratégies de reproduction et les conflits qu'elles engendrent, chez les fourmis en général et chez *Cardiocondyla* en particulier.

Cadre écologique de l'étude : la Loire

La Loire est le dernier fleuve sauvage d'Europe. Son histoire et ses riches paysages ont permis à la Loire moyenne de se voir classée en 2000 au Patrimoine Mondial de l'UNESCO entre Sully-sur-Loire et Chalonnes-sur-Loire (Figure 1). C'est ainsi que sur 260 km, 160 communes (4 départements) font l'objet d'une attention très particulière afin de protéger et entretenir leurs patrimoines culturels, historiques et naturels.

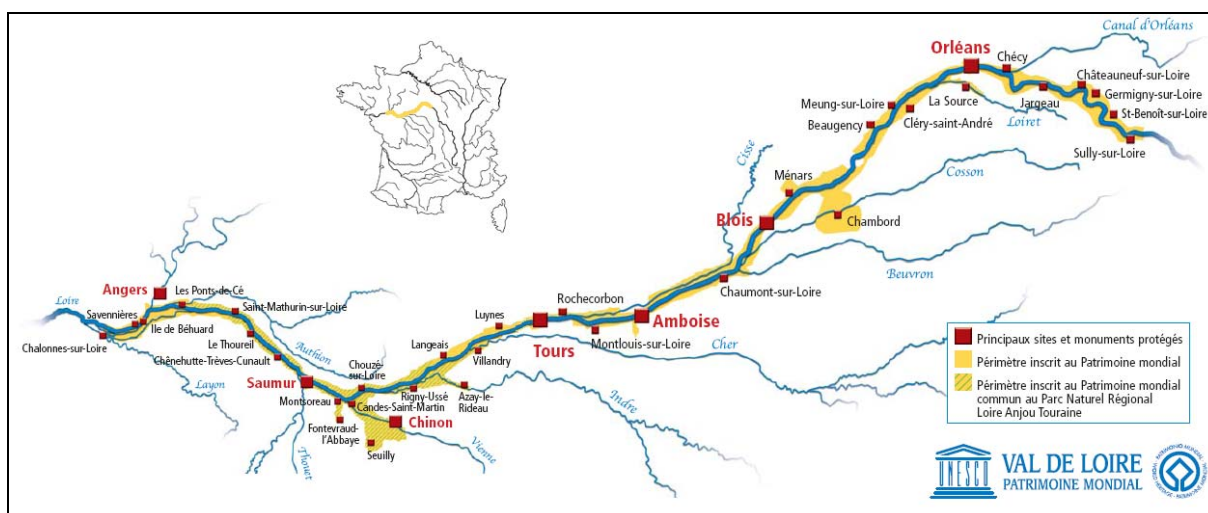


Figure 1. La vallée de la Loire entre Sully-sur-Loire et Chalonnes-sur-Loire est classée au Patrimoine Mondial de l'UNESCO depuis l'an 2000. Adapté de « Répertoire de ressources bibliographiques et documentaires du Val de Loire, patrimoine mondial », édité par la Mission Val de Loire et le Sceren-CNDP.

Depuis 1994, les pouvoirs publics ont également engagé le programme « Plan Loire Grandeur Nature » (dont l'enveloppe prévisionnelle d'Etat pour la seconde période 2000-2006 était de 35 060 000 euros), dont la vocation est 1) d'assurer la sécurité des biens et des personnes face aux risques d'inondations, 2) de satisfaire aux besoins quantitatifs et qualitatifs en eau des habitants et agriculteurs du bassin et 3) de protéger l'environnement en maintenant les qualités écologiques du milieu ou en les restaurant.

Pour mener à bien ces objectifs, de nombreuses études scientifiques dans différents domaines sont encouragées comme par exemple l'analyse de la géochimie (Grosbois 1998), des peuplements macrobenthiques (Bacchi 2000), de la végétation alluviale (Cornier 2002), de la dynamique fluviale (Gaultier 2000) et de la sédimentologie fluviale (Rodrigues *et al.* 2006). Ces travaux récents traduisent un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique pour le fleuve Loire. C'est dans ce contexte général que la Région Centre a apporté son soutien à ce travail de thèse.

Relativement peu d'auteurs se sont intéressés à l'étude de la faune en milieu ligérien. Peu d'animaux, et plus particulièrement d'insectes semblent pouvoir se maintenir de façon pérenne dans cet environnement. Les chenaux secondaires de la Loire présentent des grèves plus ou moins végétalisées (en fixation) qui constituent un environnement presque désertique durant l'été, et qui subissent plusieurs épisodes de crues chaque année de novembre à mai (Figure 2).



Figure 2. Crue de Décembre 2003 à Montlouis-sur-Loire. Photo J.-C. Lenoir.

En fonction du type de sédiments et de la végétation ligneuse qui a colonisé le milieu, ces crues vont plus ou moins remanier les dépôts alluviaux et ainsi modifier la topographie des chenaux secondaires (Rodrigues *et al.* 2006). Ces perturbations ont donc une incidence sur les populations d'animaux qui essaient de se développer dans ces milieux. De nombreuses espèces animales se sont adaptées et ne colonisent les bords de Loire que durant de brèves périodes favorables. C'est le cas de nombreux oiseaux migrateurs tel que le petit gravelot (*Charadrius dubius*), la sterne pierregarin (*Sterna hirundo*), la sterne naine (*Sterna albifrons*), et deux espèces de mouettes (*Larus melanocephalus* ou *Larus ridibundus*) qui nichent à même le sol des grèves de Loire moyenne. Certains mammifères vivent également sur des bords de Loire. Ainsi le rat musqué (*Ondatra zibethicus*), le ragondin (*Myocastor coypus*), le castor

(*Castor fiber*) et quelques loutres (*Lutra lutra*) font partie de la faune ligérienne. Certaines de ces espèces font d'ailleurs l'objet de protections internationales, communautaires et nationales (Tableau 1).

Tableau 1. Principales espèces de vertébrés protégées qui peuplent la Loire. Informations tirées de L'Inventaire National du Patrimoine Naturel (<http://inpn.mnhn.fr>).

Famille	Espèce	Protection	
Laridae 	<i>Sterna hirundo</i>	Internationale	Convention de Berne : Annexe II Convention de Bonn : Accord AEWA [1999]
		Nationale	Oiseaux protégés : Article 5
		Communautaire	Directive Oiseaux : Annexe I
Laridae 	<i>Sterna albifrons</i>	Internationale	Convention de Barcelone : Annexe II Convention de Berne : Annexe II Convention de Bonn : Annexe II et Accord AEWA [1999]
		Nationale	Oiseaux protégés : Article 5
		Communautaire	Directive Oiseaux : Annexe I
Laridae 	<i>Larus melanocephalus</i>	Internationale	Convention de Berne : Annexe II Convention de Bonn : Annexe II et Accord AEWA [1999]
		Nationale	Oiseaux protégés : Article 1 et 5
		Communautaire	Directive Oiseaux : Annexe I
Laridae 	<i>Larus ridibundus</i>	Internationale	Convention de Berne : Annexe III Convention de Bonn : Accord AEWA [1999]
		Nationale	Oiseaux protégés : Article 1, 2 et 5
		Communautaire	Directive Oiseaux : Annexe II/2
Castoridae 	<i>Castor fiber</i>	International	Convention de Berne : Annexe III
		Nationale	Mammifères protégés : Article 1
		Communautaire	Directive Habitats-Faune-Flore : Annexe II, IV et V
Mustelidae 	<i>Lutra lutra</i>	International	Convention de Berne : Annexe II
		Nationale	CITES (Convention de Washington) : Annexe I Mammifères protégés : Article 1 (Vertébrés menacés d'extinction)
		Communautaire	Règlement communautaire CITES : Annexe A Directive Habitats-Faune-Flore : Annexe II et IV

Parmi les insectes, quelques espèces d'Hyménoptères solitaires (Sphecidae) profitent des étendues sableuses pour creuser les loges permettant le développement de leurs larves. Ces espèces peuvent facilement coloniser les grèves chaque année grâce à leur importante capacité de déplacement et éviter les crues en se réfugiant dans d'autres habitats. D'autres espèces

d'arthropodes sont également présentes sur ce terrain bien que possédant des capacités de dispersion plus réduites. C'est le cas de nombreuses espèces de criquets (principalement Acridinae et Oedipodinae) qui apprécient les fortes chaleurs retrouvées dans ces environnements. Des Coléoptères ripicoles et quelques espèces d'Arachnides (*Arctosa cinerea* ou *Dictyna bicolor*) sont aussi présents dans cet environnement. Leur capacité de retrait lors des crues est importante et leurs stratégies de survie peu connues. *Cardiocondyla elegans* est différente de ces espèces car ses possibilités de retrait lors des crues semblent nulles. Au contraire de certaines espèces d'insectes sociaux qui ont une forte tendance à déménager (ex : *Myrmica* sp), elle ne quitte jamais son nid. Cependant elle survit aux crues et représente l'espèce de fourmis pionnière sur les grèves en fixation de la Loire.

L'Environnement ligérien regroupe donc des milieux qui demandent à être mieux connus pour être mieux gérés et/ou protégés. Ces milieux peuvent en général être caractérisés par les organismes vivants qui s'y développent. Etant donné que certains de ces organismes peuvent être très spécifiques de leur environnement, ils peuvent servir d'espèces bio-indicatrices.

Espèces bio-indicatrices et/ou invasives

Blandin (1986) donnait du bio-indicateur la définition suivante : « *Un indicateur biologique (ou bio-indicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui - par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques - permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées* ». Lorsque la réaction se situe au niveau populationnel et/ou communautaire (disparition ou apparition d'espèces, variation densitaire), on peut également utiliser le terme de bio-intégrateur : « *Toute disparition ou apparition d'une espèce, toute modification de l'abondance relative d'une espèce ou de la structure des peuplements d'un écosystème signifie donc une modification de l'environnement de cette espèce.* » (Echaubard 1995).

Les conditions requises par les fourmis pour se développer sont souvent très spécifiques. Dans une étude comparant différents groupes d'insectes comme bio-indicateurs potentiels, Brown (1997) a établi que les fourmis représentaient le groupe le plus pertinent. Pour King *et al.* (1998), ce sont les communautés de fourmis qui représentent les meilleurs bio-indicateurs des changements environnementaux. Par exemple en Australie, les modifications des communautés de fourmis reflètent les perturbations observées dans d'autres groupes d'invertébrés (Majer 1983 ; Andersen 1997). Les communautés de fourmis sont ainsi utilisées

comme bio-indicatrices de l'impact de certaines perturbations comme le brûlage, le pâturage ou encore le défrichage sur la biodiversité (Neumann 1992 ; York 1994 ; Vanderwoude *et al.* 1997). Dans ces mêmes régions, la richesse et la composition des espèces de fourmis est également utilisée pour évaluer l'évolution de la restauration (degré de recolonisation par d'autres espèces d'invertébrés) des anciens sites miniers (Majer *et al.* 1984 ; Majer 1985 ; Andersen 1997).

A l'inverse, certaines espèces de fourmis ayant un impact majeur sur les autres espèces endémiques des milieux qu'elles colonisent peuvent être qualifiées d'invasives. Plusieurs caractéristiques ont été reconnues aux espèces de fourmis invasives : l'unicolonialité, la polygynie, l'accouplement intranidal, la reproduction des nids par bouturage, la stérilité des ouvrières, une taille généralement petite et un régime alimentaire opportuniste (Passera & Aron 2005). Selon ces critères, certaines espèces de *Cardiocondyla* sont aujourd'hui reconnues comme étant des espèces invasives. C'est le cas notamment de *C. emery*, *C. nuda* ou encore *C. obscurior*. En effet, le genre possède plusieurs pré-requis communs aux espèces envahissantes. La polygynie et l'accouplement intranidal sont actuellement considérés comme les états ancestraux de ce genre (Heinze *et al.* 2005). Les ouvrières sont totalement stériles et certaines espèces peuvent se disséminer par bouturage. Cependant, ces envahisseurs restent discrets, probablement parce qu'ils ne sont souvent pas écologiquement dominants sur les espèces indigènes (Heinze *et al.* 2006).

Nous essaierons de définir plus tard quel peut être le statut de *C. elegans* par rapport à son environnement ligérien. Cette espèce semble en effet être, dans ce contexte, un bon candidat comme bio-indicateur. De plus *C. elegans* présente un grand intérêt myrmécologique. C'est une espèce qui a fait l'objet de peu d'études, que ce soit au niveau de sa biologie générale ou de son écologie. L'un des premiers champs d'investigations qui aide à comprendre le maintien d'une espèce dans son environnement est l'étude de sa reproduction. C'est ce que nous allons développer à présent.

Stratégies de reproduction chez les Hyménoptères sociaux.

Les insectes sociaux connaissent un succès écologique très important. Le nombre d'espèces et leur biomasse sont de loin supérieurs à celui des autres espèces d'invertébrés ou de vertébrés. Les fourmis en particulier, ont colonisé la plupart des biotopes et ceci non seulement grâce à leur système d'organisation sociale, mais aussi surtout à leur faculté à adapter leur système de reproduction.

La sélection sexuelle

La sélection sexuelle est l'un des facteurs les plus importants menant à la diversification des stratégies de reproduction. Pour avoir accès aux femelles, les mâles doivent entrer en compétition. De cette sélection ont évolué des « armements » spécifiques, des ornements énergétiquement « coûteux » à mettre en place, ou encore des comportements de cour très élaborés (Darwin 1871). Parallèlement à cette sélection de la qualité des mâles, s'est mise en place la sélection du partenaire sexuel chez les femelles (Andersson 1994). Cette sélection sexuelle peut même parfois être si forte qu'elle conduit à l'apparition de nouvelles espèces. Ainsi, les importantes variations morphologiques des mâles des espèces de drosophiles hawaïennes (nombre de soies sur les tibias, largeur de la tête (Figure 3A)) ou leurs comportements de cour très élaborés (émission de phéromones, de signaux acoustiques, ou encore leurs séquences comportementales complexes) donnent un bon exemple de l'effet de la sélection sexuelle sur la spéciation (Boake 2005). Chez certains Scarabaeidea mâles, peuvent se développer de véritables « armes » sous la pression de la sélection sexuelle. Ceci est par exemple le cas dans le genre *Onthophagus* où les mâles avec la plus longue corne ont un accès plus facile aux femelles (Emlen *et al.* 2005) (Figure 3B).

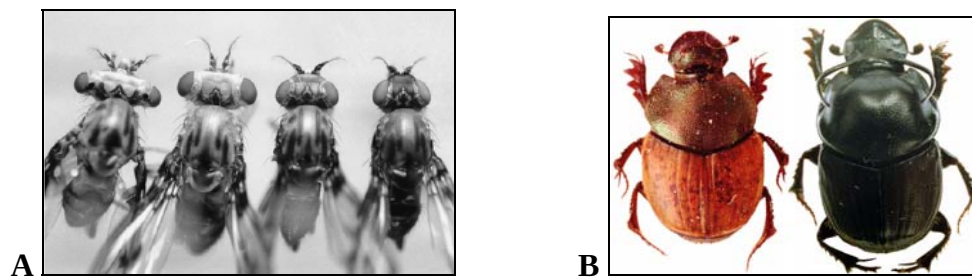


Figure 3. **A.** Forme de la tête de mâles de deux espèces de *Drosophila* en cours de spéciation. De gauche à droite : *D. heteroneura*, hybride de F1 avec une mère *D. heteroneura*, hybride de F1 avec une mère *D. silvestris*, *D. silvestris*. Photo de Todd Campbell. Tiré de (Boake 2000). **B.** Deux espèces d'*Onthophagus* avec des ornements céphaliques absentes ou très développées (à gauche *O. coenobita*, à droite *O. taurus*).

Les insectes sociaux semblent faire exception à cette règle. En effet, selon la théorie de la sélection de parentèle, tous les membres de la société s'unissent pour développer une stratégie de reproduction altruiste (Hamilton 1964) où les adaptations pour blesser ou tuer les mâles rivaux sont totalement absentes. Le schéma de base de la théorie s'établit autour d'un système monogyne / monoandre. Dans ce contexte, les ouvrières stériles issues d'une reine sont très apparentées, en raison du système de reproduction haplo-diploïde (coefficient de parenté $r = 0,75$) et aident la reine dans l'élevage de leurs frères et de leurs sœurs. Cependant, en raison des asymétries de parentèle liées à l'haplo-diploïdie, des conflits d'intérêt génétiques peuvent

apparaître à l'intérieur des colonies (Trivers & Hare 1976). Effectivement, depuis l'énoncé de cette théorie, de nombreux conflits ont été trouvés au sein du groupe des femelles chez les Hyménoptères sociaux (Passera & Aron 2005).

De fait, ces conditions de monogynie / monandrie se rencontrent finalement peu souvent parmi les Hyménoptères sociaux, et même lorsque c'est le cas, d'autres facteurs viennent s'ajouter aux prédictions de la théorie de la sélection de parentèle. Chez *Dinoponera quadricaps*, bien que la femelle pondreuse (l'ouvrière « gamergate ») ne soit fécondée que par un seul mâle (Monnin & Peeters 1998), les ouvrières ont la possibilité de pondre des œufs et entrent donc en conflit avec elle pour la production de sexués mâles. Il en est de même pour la plupart des colonies de bourdon *Bombus terrestris* (Van Honk *et al.* 1981 ; Van der Blom 1986 ; Van Doorn & Heringa 1986). Ces conflits sont encore plus importants et les stratégies de reproduction différentes lorsque les reines sont fécondées par plusieurs mâles (Figure 4, polyandrie) et/ou les colonies contiennent plusieurs reines.

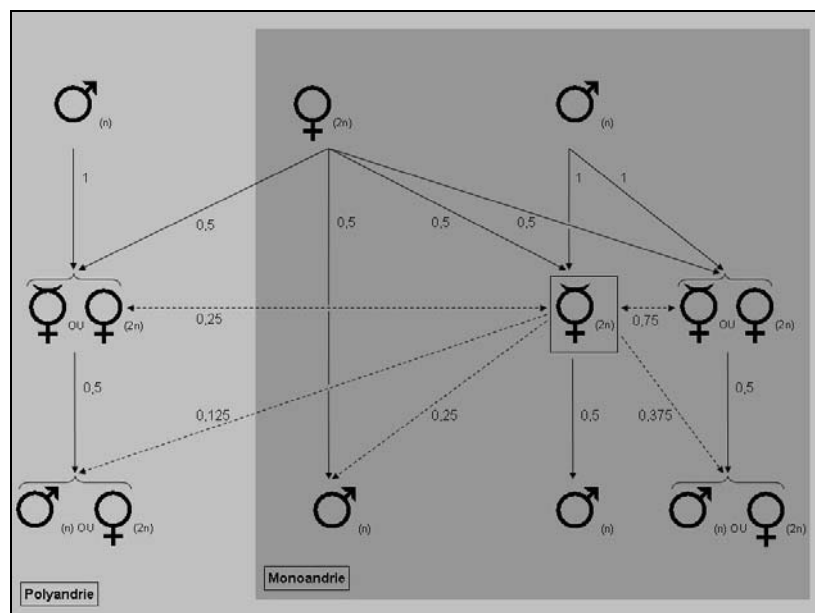


Figure 4. Coefficients de parenté d'une ouvrière avec tous ses congénères dans une société d'Hyménoptères sociaux monogyne et monoandre ou polyandre (au schéma classique ont été ajoutés les coefficients de parenté en cas de polyandrie).

De façon générale, l'organisation des sociétés d'Hyménoptères est affectée par le nombre de reines, le coefficient de parenté de ces dernières, le nombre de mâles avec lesquels elles copulent, la proportion de mâles issus des ouvrières et le taux de consanguinité (Ross 1990).

Stratégies de reproduction des femelles

Dans certaines sociétés monogynes et monoandres, les reines maintiennent leur statut de reproductrices principales par le développement de comportements agressifs envers les ouvrières. Ceci est le cas chez de nombreuses sociétés de guêpes (Pardi 1942 ; Gervet 1964 ; Tindo *et al.* 1997) ou chez les fourmis primitives (Peeters & Higashi 1989 ; Peeters *et al.* 1992 ; Monnin & Peeters 1998). Les reines peuvent également empêcher de façon chimique le développement ovarien des ouvrières grâce à l'émission de phéromones comme c'est le cas chez l'abeille domestique (Slessor *et al.* 1998 ; Hoover *et al.* 2003) ou le bourdon *Bombus terrestris* (Duchateau & Velthuis 1988 ; Bourke & Ratnieks 2001). Chez les fourmis, l'existence d'une telle phéromone n'a jamais été véritablement démontrée et l'on pense plutôt à un signal de fertilité qui conduit l'ouvrière à inhiber sa propre reproduction (Passera & Aron 2005). Le conflit entre la reine et les ouvrières pour la production des mâles dans les colonies monogynes existe mais il reste relativement faible, car même s'il reste plus avantageux pour les ouvrières de produire leurs propres fils, elles restent néanmoins plus apparentées à leurs sœurs (autres ouvrières et femelles fertiles) et à leur descendance qu'à leurs frères. Les ouvrières vont donc favoriser l'élevage de leurs sœurs.

Lorsque la reine est fécondée par plusieurs mâles, le coefficient de parenté entre les ouvrières chute, pouvant descendre jusqu'à $r = 0,25$ lorsque le nombre de partenaires de la reine est important (Figure 5).

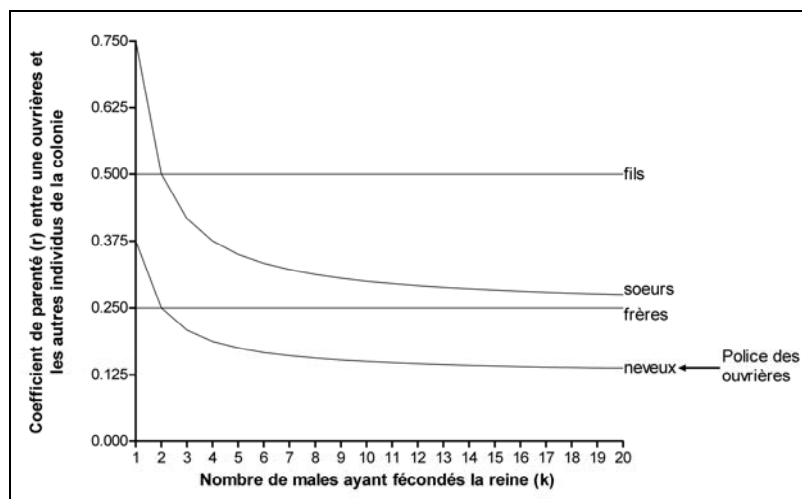


Figure 5. Effet de la polyandrie sur le coefficient de parenté entre une ouvrière et les autres membres de la colonie : une de ses sœurs en général (vraies sœurs + demi-sœurs), ses frères, ses fils ou ses neveux. Le coefficient de parenté est égal à $r = 0,25 + 0,5\left(\frac{1}{k}\right)$ entre sœurs, et égale à $r = \frac{0,25 + 0,5\left(\frac{1}{k}\right)}{2}$ entre une ouvrière et l'un de ses neveux.

Les ouvrières sont donc dans ce cas bien plus apparentées à leur propre descendance qu'à une demi-sœur. Cependant, même si les ouvrières arrivent à pondre des œufs (qui, non fécondés, donneront des mâles), un conflit entre ouvrières subsiste : certes, il est d'une part intéressant de produire ses propres fils, mais il reste plus avantageux de favoriser l'élevage de vraies sœurs, de frères ou même de « vrais neveux » (Figure 5, $k=1$), que de prendre soin de ses demi-sœurs ou de leurs fils (Figure 4, Polyandrie ; Figure 5, $k>1$). Un tel népotisme potentiel semble cependant de faible importance car les ouvrières ne sont apparemment pas capables de discriminer les différents types de larves comme appartenant à leur fratrie ou non. Des comportements de « police », où les ouvrières vont se mettre à éliminer (manger) les œufs pondus par d'autres ouvrières, vont alors se mettre en place (« worker policing »). En effet, les œufs pondus par les ouvrières peuvent être discriminés de ceux de la reine, principalement grâce à un marquage de ses œufs avec des hydrocarbures par la reine (Katzav-Gozansky *et al.* 2001 ; Martin *et al.* 2002 ; D'Ettorre *et al.* 2004 ; Martin *et al.* 2004 ; Wenseleers *et al.* 2005 ; Endler *et al.* 2006). La production des mâles par les ouvrières reste donc relativement faible dans les colonies d'Hyménoptères sociaux.

Chez certaines espèces de fourmis, ces stratégies de reproduction se complexifient encore davantage. Par exemple chez *Cataglyphis cursor*, la capacité des reines à produire des femelles par reproduction asexuée (parthénogenèse thélytoque) permet à ces dernières de maximiser la transmission de leurs gènes dans leur descendance reproductive (Pearcy *et al.* 2004 ; Percy 2005 ; Percy *et al.* 2006). Elles utilisent néanmoins la reproduction sexuée (polyandre) pour la production d'ouvrières. Ceci a pour effet de maintenir une diversité génétique importante et de faire entrer les ouvrières en conflit, régulant alors leur reproduction en faveur de celle de la reine. Cette stratégie n'est vraisemblablement permise que parce que la fondation des nouveaux nids se fait par bourgeonnement ; les reines qui partent pour initier une fondation sont assistées par de nombreuses ouvrières et sont ainsi toujours « protégées », moins soumises aux pressions de sélection environnementale. Une diminution de la variabilité génétique des reines est donc moins préjudiciable que pour des espèces dont les reines doivent fonder seules leur colonie après un vol nuptial. Le même système où les femelles sexuées sont issues de la reproduction parthénogénétique et les ouvrières de la reproduction sexuée s'observe chez la petite fourmi de feu *Wasmannia auropunctata*. Chez cette dernière, les mâles sont également clonaux. Plus précisément, les mâles d'un nid possèdent le même génotype que les mâles qui ont fécondé leur mère. Les mâles sont donc issus d'œufs fécondés dont le génotype haploïde du spermatozoïde a remplacé la totalité du génome maternel (Fournier *et al.* 2005).

Sexe ratio

Les asymétries de parenté induites par le système de reproduction haplo-diploïde sont aussi à l'origine de conflits entre les reines et leurs ouvrières quant au sexe ratio. Ainsi, les reines étant autant apparentées à leurs fils qu'à leurs filles, ces dernières devraient pondre autant d'œufs mâles que d'œufs femelles (les ouvrières ne se reproduisant pas, elles ne sont pas prises en compte dans le calcul du sexe ratio). Le sexe ratio primaire est donc censé être de 1:1. De leur côté, les ouvrières sont 3 fois plus apparentées à leur sœurs fertiles qu'à leurs frères ($r = 0,75$ et $0,25$ respectivement). Les ouvrières devraient donc orienter l'élevage des sexués en privilégiant plus les femelles que les mâles dans des proportions de 3 femelles pour 1 mâle (sexe ratio secondaire de 3:1) (Fisher 1930 ; Hamilton 1964 ; Trivers 1974 ; Trivers & Hare 1976). Cependant, le sexe ratio peut également être influencé par le coût de production différentiel entre mâles et femelles, le sexe le moins coûteux à produire étant alors privilégié (Boomsma 1989). La polyandrie, qui diminue le degré de parenté entre les ouvrières et les femelles, a pour effet de rapprocher l'intérêt génétique des ouvrières de celui de la reine (1:1) quand le nombre de mâles ayant fécondé la reine augmente. Chez les espèces où les conditions de l'expression d'un sexe ratio de 3:1 sont réunies (monogynie, monoandrie, stérilité des ouvrières), les mâles ont 3 fois plus de chances de rencontrer un partenaire sexuel. Comme ils sont trois fois moins nombreux que les femelles, il existe donc un équilibre. Si dans une population de ce type, une reine se retrouve fécondée par 2 mâles, les ouvrières ne sont plus que 2 fois plus apparentées à leurs sœurs qu'à leurs frères (2:1) et les mâles ont toujours 3 fois plus de chances de trouver un partenaire sexuel. Les ouvrières ont donc « intérêt » à privilégier l'élevage de mâles. Les ouvrières des colonies restées monogynes, par compensation, vont avoir « intérêt » à se spécialiser dans l'élevage de femelles. Se produit donc un « éclatement » du sexe ratio (« split sex-ratio ») entre les différents types de colonies (monoandres / polyandres). Ainsi, chez les fourmis, le sexe ratio est rarement en accord avec la théorie de départ et est souvent biaisé en faveur des femelles dans des proportions intermédiaires entre l'optimum des ouvrières (3:1) et celui de la reine (1:1) (Bourke & Franks 1995 ; Crozier & Pamilo 1996).

Rencontre des sexes et copulations

Habituellement, les fourmis copulent au cours de vols nuptiaux, brèves périodes où tous les sexués de différents nids se rencontrent. Ces événements nécessitent la synchronisation de l'envol des sexués de toutes les colonies d'une même localité. Le vol nuptial a plusieurs avantages : les sexués ailés (mâles et femelles) peuvent alors rencontrer des partenaires qui leur sont peu apparentés (provenant d'autres colonies) et ainsi éviter la consanguinité. Les vols nuptiaux permettent également de concentrer l'attention des prédateurs sur un nombre limité d'individus, permettant aux autres sexués de se reproduire. Enfin, ces vols permettent la dispersion des femelles et favorisent ainsi la colonisation de nouveaux milieux. Dès la fin du vol nuptial, les mâles meurent alors que les femelles tentent de fonder un nouveau nid, utilisant le sperme qu'elles ont stocké dans leur spermathèque pour féconder leurs œufs. D'autres espèces de fourmis, principalement des Ponéromorphes ou des Leptothoracines, voient leurs femelles sortir des nids puis émettre une phéromone d'appel qui va attirer les mâles. Les mâles ailés vont alors converger vers les femelles et les féconder avant que ces dernières ne tentent de fonder une nouvelle colonie. Chez les espèces polygynes, les reines peuvent également tenter de réintégrer leur nid d'origine. Enfin chez certaines espèces, la rencontre entre les sexes peut aussi se dérouler à l'intérieur même des nids. Les mâles ailés vont alors tenter de s'introduire dans une colonie étrangère pour rencontrer les femelles résidentes. Ceci est notamment le cas chez la fourmi d'Argentine *Linepithema humile* où les ouvrières vont permettre l'entrée de mâles étrangers durant la période de reproduction uniquement (Keller & Passera 1992, 1993 ; Passera & Keller 1994). Il existe également deux genres de fourmis présentant des mâles aptères : *Hypoponera* (Hamilton 1979 ; Yamauchi *et al.* 1996) et *Cardiocondyla* (Kinomura & Yamauchi 1987 ; Stuart *et al.* 1987 ; Heinze & Hölldobler 1993 ; Cremer *et al.* 2002a ; Cremer & Heinze 2003). Foitzik *et al.* (2002) ont montré que certaines colonies d'*Hypoponera opacior* possèdent des femelles et des mâles ailés, alors que d'autres produisent des mâles sans ailes semblables à des ouvrières (mâles ergatoïdes). Ces mâles développent des stratégies de copulation particulières. Un mâle va dans un premier temps localiser une nymphe femelle dans un cocon, prête à éclore. Il introduit ensuite ses pièces génitales dans une déchirure du cocon jusqu'à celles de la femelle et la féconde. Après fécondation, le mâle va monopoliser ce cocon, évitant ainsi que d'autres mâles ne s'accouplent aussi avec cette femelle. Une fois sortie du cocon, la femelle n'est plus sexuellement réceptive et n'accepte plus d'autres copulations. Ces mâles ergatoïdes, à l'instar de leurs homologues ailés d'autres colonies, possèdent un stock fini de spermatozoïdes. Ils ne doivent donc pas transférer la totalité de leurs spermatozoïdes lors d'un accouplement s'ils

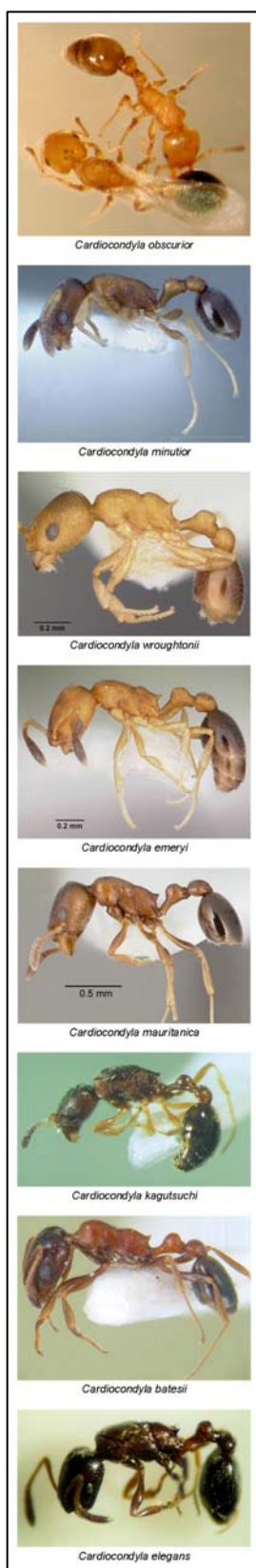


Figure 6. Vue dorsale d'un couple de *Cardiocondyla obscurior* et vues latérale d'ouvrières de quelques espèces du genre *Cardiocondyla*. Photos A. Schrempf, A. Nobile, H.T. Imai et M. Kubota.

veulent inséminer plusieurs femelles. Chez *Hypoponera nubatama*, les morphes ailés et aptères sont produits par les mêmes colonies mais à des périodes différentes, les mâles ergatoïdes apparaissant plus tôt que les mâles ailés. L'accouplement a lieu dès l'éclosion des femelles et les mâles assurent leur mono-parenté en monopolisant la femelle avec laquelle ils copulent (l'accouplement dure fréquemment plus de 2 heures) (Yamauchi *et al.* 2001). De plus, malgré l'absence apparente d'agressivité entre mâles ergatoïdes, un mâle tentant une copulation sur une nymphe ou un jeune adulte mâle semble provoquer leur mort. D'autres mécanismes de compétition sexuelle à l'intérieur des nids existent chez *Cardiocondyla*, second genre où l'on trouve des mâles ergatoïdes.

Le genre *Cardiocondyla*

Le nombre d'espèces composant le genre *Cardiocondyla* est estimé à une centaine, mais seulement un peu plus d'une quinzaine d'espèces sont bien connues (Seifert 2003 ; Heinze *et al.* 2005) et se différencient notamment par le comportement de leurs mâles et la structure de leurs colonies. De façon générale, des mâles ailés (qui vont pouvoir se disperser) côtoient des mâles ergatoïdes qui vont se reproduire à l'intérieur des nids avec les femelles, toutes ailées. Les espèces de *Cardiocondyla* sont monogynes ou polygynes. Ainsi, *C. obscurior*, *C. minutior*, *C. wroughtonii* et *C. emeryi* (Figure 6) sont des espèces polygynes (quelques reines par colonies) dont les mâles ergatoïdes s'engagent dans une compétition mortelle pour l'accès aux femelles (Kinomura & Yamauchi 1987 ; Stuart *et al.* 1987 ; Heinze & Hölldobler 1993 ; Heinze *et al.* 1998). Chez *Cardiocondyla obscurior*, les mâles aptères possèdent des mandibules modifiées en forme de sabre. Cette adaptation morphologique au combat ne leur permet cependant pas de tuer leurs adversaires ; ils ne peuvent que les immobiliser. Le mâle assaillant dépose alors sur la cuticule de son adversaire une gouttelette annale contenant une phéromone qui va déclencher l'agressivité des ouvrières et les inciter à tuer le mâle ainsi marqué. D'autres espèces ont des mandibules moins longues mais

pourvues de denticules bien développées. Les mâles matures peuvent alors tuer les jeunes mâles ergatoïdes dont la cuticule n'est pas encore sclérotinisée (Kinomura & Yamauchi 1987 ; Stuart *et al.* 1987 ; Yamauchi & Kawase 1992 ; Heinze *et al.* 1993 ; Yamauchi & Kinomura 1993 ; Heinze *et al.* 1998). Les mandibules en forme de sabre semblent être le caractère ancestral, les mandibules dentelées ayant dérivé de cet état ancestral au cours d'une seule étape évolutive (Heinze *et al.* 2005). Les mâles ailés sont très bien tolérés par les mâles ergatoïdes, en partie parce qu'ils miment l'odeur des femelles ailées (Cremer *et al.* 2002b). Après une courte période de copulation dans le nid, ils se dispersent à l'extérieur pour rencontrer des femelles d'autres colonies. *C. mauritanica* et *C. kagutsuchi* d'Okinawa sont également des espèces polygynes mais on ne retrouve plus de mâles ailés chez ces espèces (Heinze & Hölldobler 1993 ; Heinze *et al.* 2005). Finalement, *C. batesii* et *C. ulianini* et d'autres espèces eurasiennes sont des espèces monogynes et ne possèdent également que des mâles ergatoïdes. Les mâles ergatoïdes des espèces monogynes sont en général plus nombreux et plus tolérants que ceux des espèces polygynes (Figure 7) (Boomsma *et al.* 2005 ; Schrempf *et al.* 2005). L'évolution du nombre de reines depuis un état ancestral de polygynie vers la monogynie semble être associée à l'évolution du comportement des mâles ergatoïdes : depuis un état ancestral d'agressivité importante vers un comportement dérivé de plus en plus tolérant (Heinze *et al.* 2005).

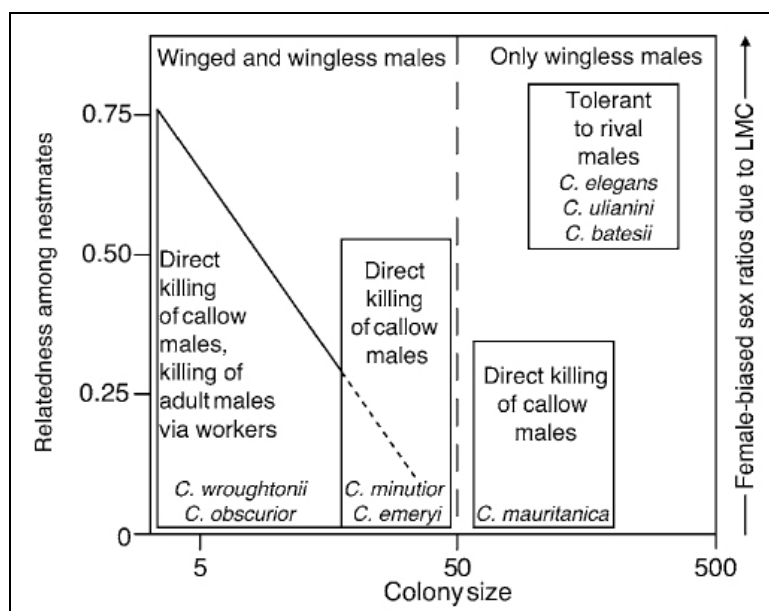


Figure 7. Nombre d'individus de la colonie (échelle logarithmique) et leur coefficient de parenté comme variables influençant le polymorphisme des mâles (mâles ailés ou ergatoïdes) chez *Cardiocondyla*. Les coefficients de parenté sont déduits du nombre de reines par colonies. Tiré de Boomsma *et al.* (2005).

Les mâles ergatoïdes du genre *Cardiocondyla* se distinguent également par une physiologie particulière. Alors que leurs frères ailés ont, comme tous les mâles de fourmis, un stock fini de spermatozoïdes au moment de leur éclosion, la spermatogenèse des mâles ergatoïdes est continue. Ceci leur permet de copuler avec des femelles tout au long de leur vie (Heinze & Hölldobler 1993). Cependant, les mâles ne vivent que durant les quelques mois de la saison de reproduction.

Cardiocondyla elegans

Cardiocondyla elegans Emery, 1869, est une petite myrmicine d'environ 2,3 mm de long (Figure 8). Bernard (1968) indique qu'elle se distribue dans la partie européenne et asiatique de la mer Méditerranée (Espagne, sud de la France, Italie, Grèce, Bulgarie, Turquie et Palestine). Cet auteur a fait une bonne description des ouvrières et des femelles ailées, mais a décrit les mâles comme étant des reines appartenant à une autre espèce parasite de fourmis, *Xenometra gallica*. Cette erreur est certainement due au fait que les mâles de *C. elegans* ont une couleur jaune-orangé et qu'ils sont ergatoïdes (morphologiquement semblables aux ouvrières, sans ailes). Ils diffèrent donc beaucoup de la plupart des mâles d'autres espèces de fourmis qui généralement sont ailés et de la même couleur que les autres membres de la colonie. Baroni Urbani (1973) a corrigé cette erreur.



Figure 8. *Cardiocondyla elegans*. Une ouvrière est en train de porter attention à une larve de stade 3 pendant que, plus haut, une femelle ailée subit les sollicitations d'un mâle ergatoïde. Photo J.-C. Lenoir.

Contrairement à d'autres espèces du même genre, comme *C. minutior* ou *C. mauritanica*, où les mâles ergatoïdes sont en faible nombre (1 à 3 par colonie) et extrêmement agressifs (Heinze 1997), les mâles de *C. elegans*, uniquement ergatoïdes, peuvent être relativement nombreux à l'intérieur des nids et sont mutuellement tolérants (voir Article 1).

En France, *C. elegans* a été signalée par Bernard (1968) sur les bords de la Dordogne dans le Lot. Elle a récemment été découverte sur les grèves fixées des bords de la Loire (Lafréchoux *et al.* 1999) et a également été repérée sur les rives de l'Allier et de la Durance. En Loire, on la retrouve plus précisément de Saint-Père-sur-Loire jusqu'à Candes Saint Martin (Lafréchoux *et al.* 1999)¹. Cette localisation semble être sa limite septentrionale. Dans cet environnement, les colonies de *C. elegans* ne présentent pas d'activité de la fin de l'automne

¹ Ces observations ont été principalement faites par A. Lenoir (Loire, Allier et je l'ai accompagné récemment sur les bords de la Durance, près d'Avignon, où nous avons observé de nombreux nids de *C. elegans*). C'est L. Péru qui a effectué les observations au niveau de Saint-Père-sur-Loire. J.-L. Mercier a observé cette fourmi au niveau de Candes Saint Martin, en amont de la confluence Loire-Vienne, uniquement sur les rives de la Loire.

jusqu'au début du printemps certainement en raison des faibles températures. C'est durant cette période que se déroulent généralement les crues de la Loire (Figure 9). Dès la mi-mars, les premières colonies reprennent leur activité qui débute par la réouverture et l'entretien du nid. C'est également à cette période que les très nombreuses femelles ailées, fécondées l'année précédente, prennent leur envol et se dispersent. Quand elles retombent au sol, elles détachent rapidement leurs ailes et cherchent un endroit propice à la fondation d'un nouveau nid. Ces fondations semblent se faire de façon semi-claustrale. La reine fondatrice sort régulièrement de sa loge, et referme l'entrée à l'aide d'un grain de sable, avant de faire de brèves explorations alimentaires de quelques dizaines de centimètres (observation Lenoir J.-C. et Mercier J.-L.).

Au mois de mai, les colonies se vident progressivement de leurs femelles ailées et finissent par ne compter que des ouvrières. Le mois de juin est principalement dédié au fourragement. Bien que les nids puissent être relativement proches (les nids trouvés les plus proches durant cette thèse étaient distant de 12,5 cm) et la distance de fourragement importante (au-delà de 5 m du nid), la rencontre d'ouvrières de différents nids ne provoque aucune agressivité. Les protagonistes de ces rencontres s'évitent rapidement et continuent leur activité de fourragement solitaire. Quelques comportements agressifs de courte durée peuvent être observés à l'entrée d'un nid si une ouvrière étrangère rencontre une résidente, mais cette observation reste rare.

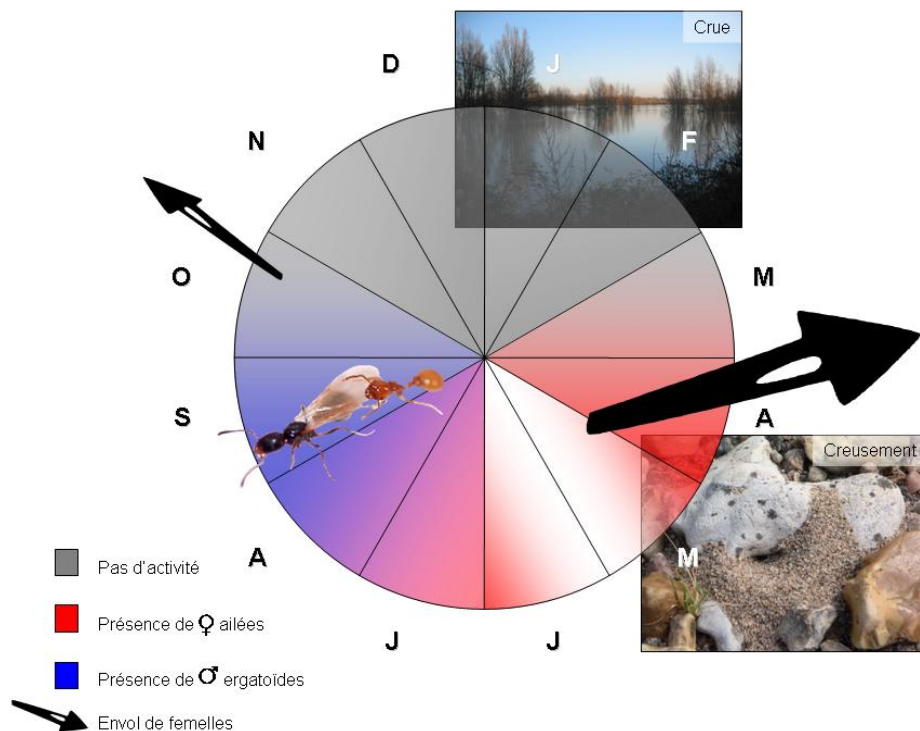


Figure 9. Cycle biologique de *C. elegans* (Lenoir J.-C. et Mercier J.-L., en préparation).

De juillet à la fin du mois de septembre, de nouveaux sexués apparaissent dans les colonies (Figure 8) et les accouplements prennent place dans les nids. Les ouvrières s'occupent de rassembler et de garder les femelles ailées en groupe, facilitant leur localisation par les mâles ergatoïdes. Ces derniers développent alors un comportement de cour et s'accouplent avec les femelles. La Figure 10 montre que le comportement copulatoire des mâles semble être défini par 9 items comportementaux très liés les uns aux autres et réalisés dans un temps très court (Guilbert 2005). Le comportement stridulatoire paraît se détacher des autres en jouant un rôle central dans le déroulement de la séquence copulatoire (en accord avec de précédents résultats obtenus par Mercier J.-L.) et indispensable à la réalisation de cette dernière.

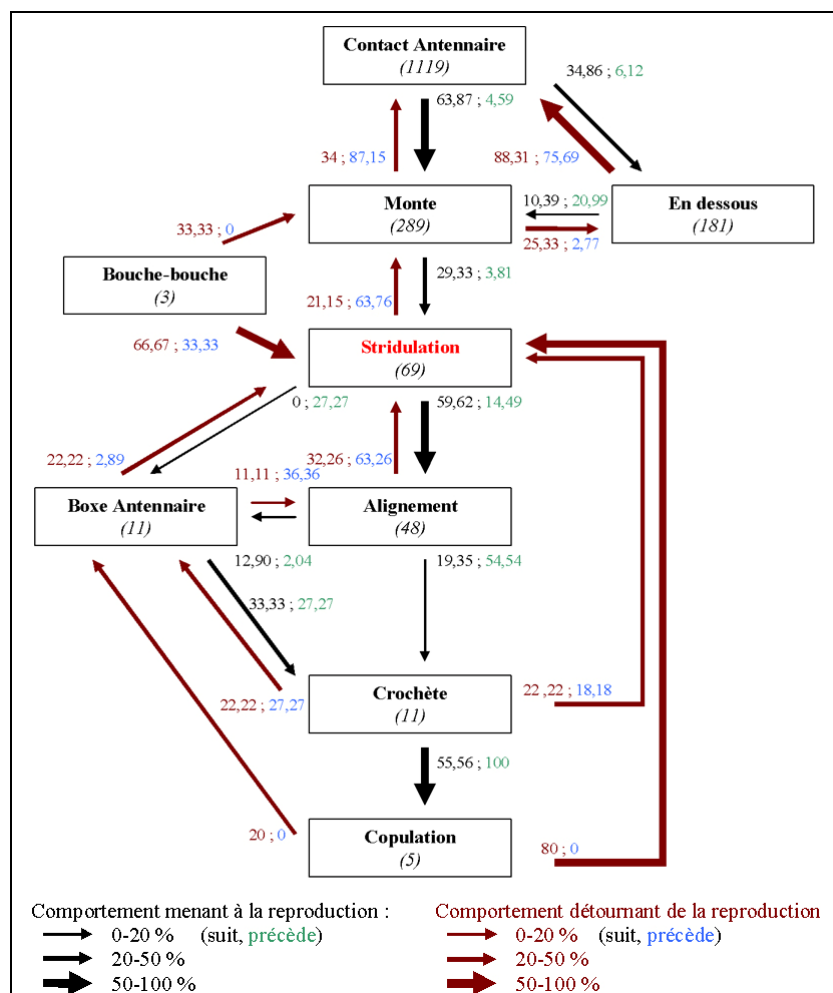


Figure 10. Comportement reproducteur observé chez le mâle *C. elegans*. Tiré de Guilbert (2005).

Ce comportement peut être considéré comme une passerelle entre deux ensembles comportementaux : les prises de contact (contact antennaire, en-dessous et monte) et les comportements consacrés à l'exécution motrice de la copulation (alignement, crochète et

copulation). Ces deux ensembles peuvent être complétés par des comportements annexes comme le « bouche-bouche » et la « boxe antennaire » (Mercier J.-L. *et al.*, en préparation). Finalement, les mâles meurent tous à l'automne. Ils sont apparemment chassés de leur nid, comme chez l'abeille domestique (Morse *et al.* 1967 ; Free & Williams 1975 ; Page & Peng 2001), transportés puis abandonnés par des ouvrières. Les femelles fécondées peuvent tenter de se disperser en fonction des conditions climatiques mais la majorité d'entre elles restent dans les nids afin de passer l'hiver et fonder de nouveaux nids le printemps suivant.

Objectifs et plan général de la recherche

Comme nous l'avons vu en début d'introduction, depuis 1994, dans le cadre du Plan Loire Grandeur Nature, les environnements ligériens font l'objet d'investigations de plus en plus nombreuses pour mieux comprendre leur fonctionnement et mieux connaître les communautés qui les habitent, afin de recenser les sites d'intérêt et savoir comment faire pour les gérer et/ou les préserver. La découverte de *C. elegans* sur les bords de la Loire (Lafréchoux *et al.* 1999 ; Péru 1999) a conduit à se poser un certain nombre de questions sur la biologie, sur les conditions d'établissement et de maintien de cette fourmi.

Encore aujourd'hui, peu de travaux ont été menés sur cette espèce. Ceci est relativement surprenant car le fait de la retrouver dans des environnements où les efforts de préservation sont importants aurait dû en faire un modèle d'étude privilégié. Ensuite, la singularité de sa structure reproductive (uniquement des mâles ergatoïdes tolérants) parmi les hyménoptères sociaux aurait dû attirer l'attention de nombreux myrmécologues.

Nous avons donc décidé de prendre *C. elegans* comme modèle d'étude afin de compléter les connaissances sur ses conditions de vie et de rendre compte de l'intérêt de cette espèce pour la compréhension et la gestion de certains environnements, mais également pour la compréhension des stratégies de reproduction chez les fourmis (Figure 11).

Tout d'abord, il nous a semblé important de **définir les conditions de vie de cette espèce**. Pour cela nous avons mené des études de **biologie**, de **pédologie** et de **botanique**. Ces travaux sont réunis dans l'article 1. Ainsi la structure des nids et le nombre d'individus par nid ont été déterminés par un certain nombre « d'extractions » de nids. Des sondes de température et d'humidité ont été installées à différentes profondeurs sur le terrain afin de déterminer les conditions de vie durant toute l'année. Enfin une étude des caractéristiques pédologiques et de la végétation associée a été réalisée pour déterminer la spécificité de *C. elegans* par rapport à son environnement et son intérêt en tant que bio-indicateur.

Suite à ces premiers travaux, une étude **écologique** a été menée afin de comprendre **l'effet de l'environnement social et physique** (compétition intra-spécifique et crues) sur la **structure d'une population** de *C. elegans*. Pour cela, nous avons suivi et analysé la distribution des

nids d'une population de *C. elegans* durant deux années consécutives. Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'article 2.

Enfin, le fait que les fourmis de ce genre produisent des mâles ergatoïdes permet de s'interroger sur les **stratégies de reproduction** utilisées par cette fourmi. Nous avons donc élaboré des outils nous permettant d'étudier la structure **génétique** des nids et des populations (article 3). Finalement, l'étude du génotype et des **comportements des sexués** a permis de déterminer que cette espèce se reproduit de façon tout à fait singulière. Cette dernière partie a été développée dans les articles 3 et 4.

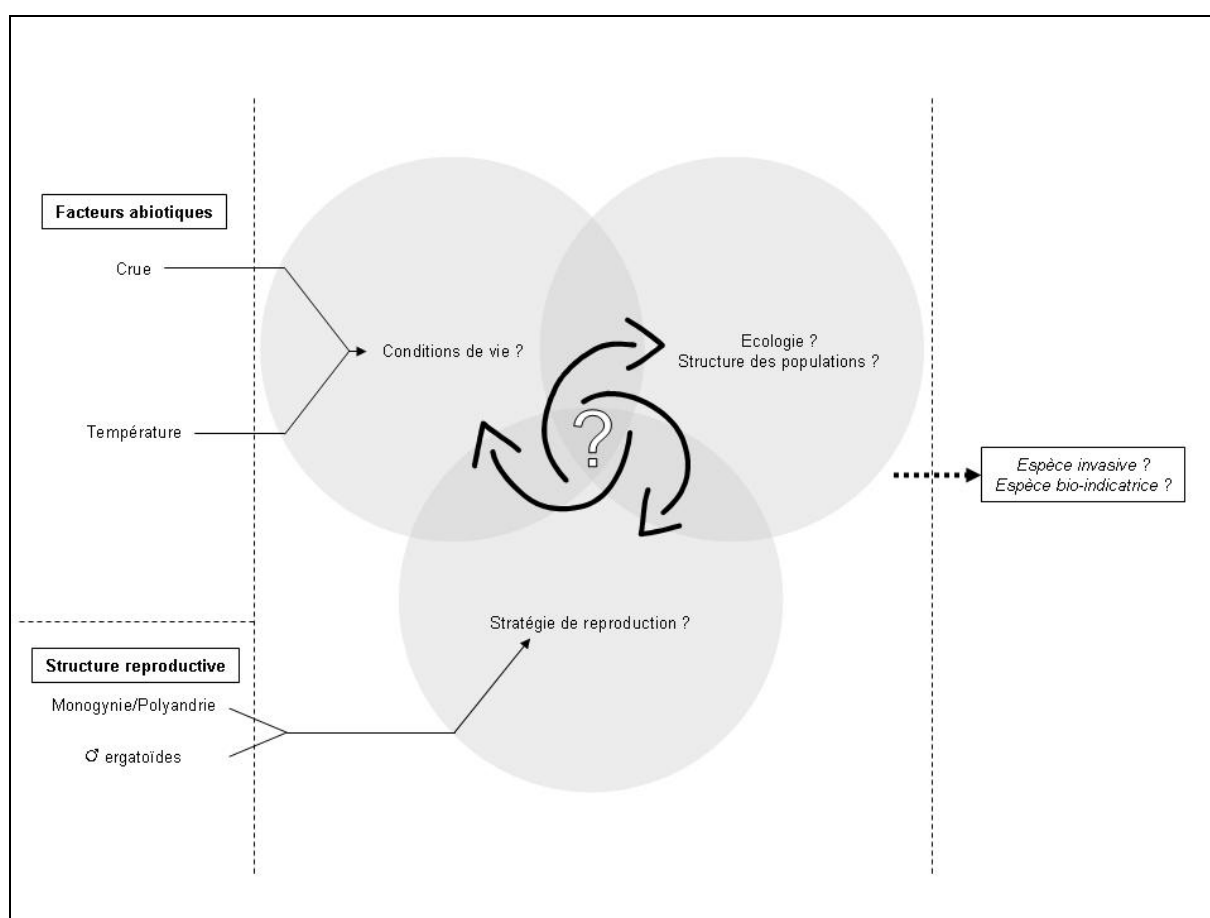


Figure 11. Schéma indiquant les objectifs de ce travail de thèse sur *C. elegans*.

Biologie et écologie

Article 1. Structure des nids de *Cardiocondyla elegans* : comment résister à la noyade et aux fortes températures ?

Résumé

La découverte de *Cardiocondyla elegans* sur les bords de la Loire moyenne fut surprenante. En effet, cette espèce est méditerranéenne, préférant des climats plus chauds que ceux de la région Centre. Cependant, les grèves de Loire lui offrent des conditions de développement apparemment idéales. Nous avons voulu savoir quelles étaient les conditions de vie de cette fourmi et si sa présence pouvait être utilisée pour caractériser un habitat particulier. Cette étude montre quelles sont les conditions abiotiques (composition très particulière des sédiments, fortes températures rencontrées durant l'été, influence des pluies, des crues) et biotiques (plantes associées) que rencontre *C. elegans*. Pour cela, nous avons placé des sondes mesurant la température et la quantité d'eau dans le sol à différentes profondeurs dans un environnement où les nids de *C. elegans* sont nombreux. Nous avons également analysé la granulométrie de ce sol et déterminé l'ensemble des espèces végétales qui s'y développent. Nous en tirons un certain nombre de conclusions sur la survie de *C. elegans* et son utilité dans la caractérisation de son environnement.



Jean-Christophe Lenoir, Stéphane Rodrigues, Alain Lenoir et Jean-Luc Mercier. Nest structure in the ant *Cardiocondyla elegans* (Formicidae, Myrmicinae): how do they withstand flooding and high temperatures in alluvial deposits? (soumis à *Landscape Ecology*).

Nest structure in the ant *Cardiocondyla elegans* (Formicidae, Myrmicinae): how do they withstand flooding and high temperatures in alluvial deposits?

Jean-Christophe LENOIR*, Stéphane RODRIGUES§, Alain LENOIR* and Jean-Luc MERCIER*

* IRBI, Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, Université François Rabelais, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France.

§ Laboratoire de Géologie des Environnements Aquatiques Continentaux, UPRES EA2100, UFR Sciences et Techniques, Université François Rabelais, Parc de Grandmont, 37200, Tours, France.

Corresponding author: Jean-Christophe Lenoir.

Université François Rabelais, IRBI, Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

Tel: (33) 2 47 36 71 23

Fax: (33) 2 47 36 72 85

E-mail: jean-christophe.lenoir@etu.univ-tours.fr

Date of manuscript draft : 3 May 2006

Manuscript word count : 4847

Abstract

Cardiocondyla elegans biology was investigated in order to determine its living conditions and whether it can be used as bioindicator of its natural environment. We studied the nest architecture and physical parameters (soil temperature, humidity and composition) as well as associated flora from a population of the Loire River (France). The nest architecture is similar to that of many other subterranean ant species, consisting of a vertical pipe connecting chambers. The sediments are composed of less than 60% fine sand, about 25% fine gravel and at least 20% coarse gravel. This soil composition allows *C. elegans* to build nests that are sound structures and provide refuge spaces during the annual floods. Although the surface temperature can easily exceed 45°C, the deeper chambers of the nest remain cooler than 30°C. The humidity fluctuates with rain but has no apparent consequences on the ant populations. More damaging are notable increases of the soil water content from rises in the watertable during flood events. This is one of the first studies on the abiotic factors affecting the life history of an ant species. We found that *C. elegans* can be used as an indicator (in addition to plants) to characterize the morphological evolution of the secondary channels of the Loire River.

Keywords: Ant; *Cardiocondyla*; Flooding; Loire River; Soil structure; Temperature; Volumetric water content.

Introduction

Eusociality is defined by three main conditions: cooperative care of the young, two or more overlapping generations, and division of reproductive labor (Wilson 1971). These requirements mean that members of the colony must live in the same communal refuge, the nest, which may contribute to the evolution of eusociality. Except for the army ants and other nomadic species that do not use a sessile nest but where the individuals form a labile “nest” with their own bodies, the nest architecture is more or less characteristic of the species. Some social hymenoptera like hornets and wasps construct paper nests and bees usually use wax. While some ants use silk (e.g. *Oecophylla*, *Polyrhachis*) or can be associated with plants, most of them nest underground.

A nest must provide specific living conditions, especially in terms of temperature and humidity. Temperature can be regulated by the activity or specific behaviours of workers. For example, worker activity of wood ants inside their nest maintains the temperature near 30°C even if the external temperature varies (Rosengren et al. 1987). Honeybee workers (Kronenberg and Heller 1982; Fahrenholz et al. 1989; Starks and Gilley 1999; Bujok et al. 2002; Jones et al. 2004) and bumblebees (O'Donnell and Foster 2001) use heating or fanning behaviours to maintain their nests at a constant temperature. In *Vespa crabro*, temperature homeostasis is maintained by the resident insects' body heat along with moisture maintained by a vapour flux induced by the nest's specialized structure (Klingner et al. 2005). In some other social Hymenoptera, workers do not play a role in thermoregulation. For example in the Vespidae *Polybia paulista* and *P. occidentalis*, the nest structure is sufficient to minimize the effects of rapid changes in outside temperature (Hozumi et al. 2005). Regulating water can also be a problem. Excess water due to intense rainfalls elicits unusual behavioural responses from workers, such as the communal peeing of the bamboo-nesting ant *Cataulacus muticus* (Maschwitz and Moog 2000). Other species like the mud-dwelling ants *Polyrhachis sokolova* (Nielsen 1997) and *Camponotus anderseni* (Nielsen et al. 2006) prevent tidal inundation by collapsing the nest entrance during the tide, keeping their nest chambers dry. Some other Hymenoptera withstand periodic river flooding. For example, the ground-nesting bees *Andrena vaga* (Fellendorf et al. 2004) and *Halictus rubicundus* (Potts and Willmer 1997) can be particularly endangered by flooding; when nests were inundated, all larvae in brood cells died. *Solenopsis invicta* exhibits a peculiar behaviour during floods: the whole colony (workers, queen and brood) gather into a mass that floats on the water's surface (Vinson and Sorensen 1986; Anderson et al. 2002; Haight 2006).

Few studies focus on the architecture of the nests, and most that do give qualitative descriptions; quantitative studies on nest architecture are rare. Tschinkel (1987) carefully described many aspects of the nest structure of *Prenolepsis imparis*, and more recently documented the nest architecture and sociometry of *Pogonomyrmex barbatus* (Tschinkel 1998; 1999; 2004). Mikheyev and Tschinkel (2004) studied the nest structure of *Formica pallidefulva*. In all these species, nests are composed of two basic units: descending vertical pipes and bear horizontal chambers.

In the Loire valley, the northern area of its distribution, the Mediterranean ant *Cardiocondyla elegans* lives in patchy environments with indigenous plants and birds. Few elements are known concerning the living conditions of this species. The aim of this study is to characterize the nest structure and the environmental parameters required for the establishment of *C. elegans* colonies. Moreover, this paper highlights how *C. elegans* can be used to characterize the metamorphosis of alluvial environments.

Methods

Subject:

Cardiocondyla elegans Emery, 1869, is a small, black myrmicine ant (c.a. 2.3 mm long) that lives in sandy and moist soil (e.g. alluvial deposits). Bernard (1968) reported that *C. elegans* is a Mediterranean ant that builds nests on river sides. *C. elegans* develops in patched environment (specific alluvial deposits) where the density of the nests can reach up to 1 nest per square meter (Lenoir et al. in prep).

The studied colonies were located on the left bank of the Loire River, 15 Km upstream of the city of Tours, in the village of Montlouis-sur-Loire (Indre et Loire, France) (Figure 1). In this area, the deep main channel of the Loire is fringed by topographically higher marginal areas. Within these floodplain environments, perennial vegetated islands are separated by secondary channels inundated only during floods. These channels are subjected to a severe colonization by pioneer trees (Rodrigues et al. 2006) such as the black poplar (*Populus nigra*) and other specific herbaceous communities (see below).

#Figure 1 approximately here#

Specifically, the nests are located in the bed of secondary channels where deposits are mainly composed of a mixture of siliceous sand and gravels. Nests present on the site are located close to poplar clumps. Although these areas are quite stable, sediments reworking can occur during high magnitude flood events.

The population of *C. elegans* studied in this paper has been established for at least 2 years. *C. elegans* was the only ant living on these sites during the studied periods.

Nest structure:

The nests were excavated from April to October 2003, from June to July 2004, and from May to September 2005. The nest structure was studied by digging a pit close to the nest entrance and exposing chambers horizontally one by one from the top. Chambers have a maximum 5 mm high and have variable surfaces. The depth of each chamber was recorded and all the ants inside were collected and counted. Data acquired from the site of Montlouis-sur-Loire (18 nests) were completed with data obtained from the original place where this species was firstly described by Bernard (1968): Carennac (Lot, France, 9 nests).

Species associated with C. elegans:

Species of plants present on the same sites with *C. elegans* in Montlouis-sur-Loire from April to October 2004 were described and identified according to data from Cornier (2002).

Grain size analysis:

The secondary channel of the Loire River at Montlouis-sur-Loire provides an environment where hundreds of *C. elegans* nests were recorded (Lenoir et al. in prep). In order to characterize the grain size of the sediments, a 400 g sample of the sediments was taken from different depths and analyzed. Increments of 0.1m were taken from the surface to 0.7 m in depth. Samples were dried before sieving in the lab using a standard shaker (ROTAP) during a time lapse of 10 minutes. Then, the sediments retained on each of the sieves were weighted (Griffiths 1967; Folk 1974; Bunte and Abt 2001).

Environmental conditions of sediments:

Variations of temperature and Volumetric Water Content (VWC) were investigated on the site of Montlouis-sur-Loire. Six water content sensors (CS616 water content reflectometer) were first calibrated, then paired with six temperature sensors (107 temperature probe) and placed in the sediments every 0.1 m from 0.2 m to 0.7 m deep. Each sensor gave one measurement per hour and data were stored in an energetically autonomous datalogger (CR10X Campbell Scientific, Inc., coupled with a solar panel).

Results*Nest structure:*

The nest of *C. elegans* is a vertical pipe (diameter = 2 mm) that connects serial chambers. The nests have from 4 to 19 chambers (median ($\pm$ SIQR) = 10 ± 2.8 ; N = 27; Figure 2). The depth of the nests varies between 0.18 m and 0.57 m while the median depth of the chambers is 0.41 ± 0.06 m (N = 27). Most of these chambers have been built under the lower face of a pebble and the chamber walls were covered with an unidentified grey substance that sticks the sand grains together. On the floor of some of the excavated chambers, the workers built a pipe edge around the vertical pipe going down to the lower chamber (Figure 3).

#Figure 2 approximately here#

#Figure 3 approximately here#

The nests always contain a single queen (monogynous) that is always found in one of the deeper chambers. Each nest contains, during the reproductive period, several hundred workers (mean number $\pm$ SD of workers per nest = 204.43 ± 182.09 ; up to 800; N = 42). Mature sexuals are present in the nests from July to October. This species has specific orange to yellow, wingless, ergatoid males (mean number of males per nest = 5.27 ± 4.31 ; N = 37) and regular winged females (mean number of winged females per nest = 76.64 ± 78.15 ; N = 42). During the winter period, only the females remain in the nests whereas the males die in October.

The depth of a nest is significantly and positively correlated with the number of workers (Spearman correlation test, $N=27$, $R=0.4670$, $P=0.0141$), whereas the number of chambers composing the nest is not (Spearman correlation test, $N=27$, $R=0.3619$, $P=0.06396$).

Species associated with C. elegans:

It is interesting to note that *Echium vulgare*, *Oenothera biennis* and *Plantago scabra* are plants from minor channels and therefore typically grow in places similar to *C. elegans*' typical habitat (Table 1). Other plant species like *Eryngium campestre* and *Sedum album* are typical of plant communities that are not generally associated with water. These communities are defined as pioneer and post-pioneer in more or less definitive calcite sand ("Natura 2000" code: 6120). The other plants are very common and not associated with a specific environment.

#Table 1 approximately here#

Structure and grain size of the sediments:

Grain sizes of the sediments in which *C. elegans* dig their nests are relatively heterogeneous. From the surface to a depth of 0.3 m, the sediments consist mainly of coarse gravels (particles coarser than 20 mm). The significant proportion of gravels (more than 50 %) illustrates the presence of an armour layer (surface veneer lying on a finer sediment mixture). Below 0.5 m down, sands dominate (>60%). In addition, there is the same proportion of fine gravels (size ranging from 2 mm to 20 mm: 18% to 33%) from the surface to a depth of 0.7 m (Figure 4). This peculiar composition appears to be characteristic of the *C. elegans* habitat. Chambers are not deeper than 0.57 m and nest were never found in fine sand.

#Figure 4 approximately here#

Environmental conditions of sediments:

Temperature:

The sediment temperatures, where *C. elegans* lives, vary on both a seasonal and daily basis. On a seasonal basis, the temperature at a depth of 0.2 m ranges from -0.35°C during winter to 36.7°C in summer (Figure 5A). Daily variations of the temperature according to the depth are important; they range from 1.5 to 3.5°C in the upper layers of the sediment, from the surface to 0.4 m deep (Figure 5B). The daily variation of the temperatures is less marked in the deeper layer (below 0.4 m) with less than a 1°C difference between the warmest and coolest period of the day.

As most of the heat is produced by the sunshine, the heat disperses within the sediments from the surface to the deeper layers. Then, temperature through sediments consists in a succession of amortized hot and cold waves according to the time of day. Soils at a depth of 0-0.4 m reach maximum temperature at the beginning of the night after a sunny day (31/07/2004; 20:00), and sediments below a depth of 0.5 m reach their maximum temperature only the next morning (01/08/2004; 10:00) (Figure 5C). The foraging activity of *C. elegans* depends on the temperature outside the nest. The first ants leave the nest for foraging when the temperature is above 15°C . When the temperature of the sediments surface reaches 45°C , all foragers go back to their nests. The ants will forage again only when the temperature of the soil surface is below this critical point.

#Figure 5 approximately here#

Volumetric water content VWC:

During most of the year, the sediment within which *C. elegans* lives can be divided in two layers: the upper part of the nest (0.2-0.3 m) contains much more water than the lower one (0.4-0.7 m) (Figure 6A). During the warmest periods, a humidity inversion occurs: the upper layer of soil becomes drier than the deeper one. At these periods, the soil is drier overall, and the sensor at 0.4 m deep showed a value of 0 twice during the period from June 2004 to February 2006. The general scenario can be disturbed by two kinds of events: rains or floods. Rains are relatively frequent and involve a low increase of VWC (≈ 1.5 times). The observed delay for VWC increases according to the depth of the sensors confirms that the fallen water of rains infiltrates from the surface to the depth, activating the sensors from the upper to the lower one (Figure 6B). Flood is a more important event in term of water stress. The VWC increases from 4 to 5 times the normal value and the sediments can contain up to 0.8 m^3 of water per m^3 of soil (Figure 6C). The first sensor that measures an increase of VWC

is the deeper one and the other sensors show, one after the other, that the flood begins by a rising of the watertable (overflowing from the main channel may occur after that). According to each of these two phenomena (rain and flood), it seems that water fluxes vary within the sediments: from the highest to the deepest slides during rains events and from the deepest to the highest zones during the floods.

#Figure 6 approximately here#

Discussion

Observations and measurements done during this study allowed the characterization of the nest structure of *C. elegans*. Nests consist of a vertical pipe connecting a series of chambers. Nests have a median depth of 0.42 m and about 10 chambers. The depth of the nests depends on the number of workers. *C. elegans* can live only in very restricted areas such as alluvial deposits with specific grain size. For the Loire River, the sediments must have less than 60% of fine sand, about 25% of fine gravel and at least 20% of coarse gravel (Figure 4). This structure may allow the retention of air pockets within the sediment during the flood. This specific composition of the alluvial deposits is currently found close to poplar clumps in area where sediments can be reworked only during high magnitude floods.

The variation of temperature within the sediments is identified as a key parameter for the activity of *C. elegans*. During the summer, the surface soil temperature can frequently exceed the critical foraging temperature (45°C), constraining ants to stay into the nest. But inside the nest, temperature can also reach high values. The maximum temperature recorded at 0.2 m deep was 36.7°C (Figure 5A). The heat disperses towards the deepest layers with time (Figure 5C) and the daily variation decreases with depth (Figure 5B). Below 0.5 m, soil temperatures vary less than 1°C. Buschinger (1973) showed that the daily temperature variation can have an influence on the brood development of ants. During winter, the ants have to survive whereas nest temperatures drop below 5°C. This resistance was already documented for the nests of *Leptothorax nylander* (Plateaux 1970), which overwinters at temperatures ranging from 5°C to 8°C.

Humidity also influences the *C. elegans* population development. The alluvial deposits of the studied area contain most of the time about 0.12 m³ of water per m³ of sediments. Nevertheless, some events such as rains, floods and dryness, can change the water volume inside the sediments. Although the upper part of the sediments (0.2 - 0.3 m deep) is usually

wetter than the deeper parts, dryness inverts this tendency. During dryness events, the upper parts of the sediment column become drier than deeper layers and occasionally lack water (Figure 6A: end of June 2005). One can hypothesize that during hot and sunny periods, water from the upper part of the sediments evaporates while the deeper part is protected from evaporation and remains moist from humidity from the watertable. Rains promote a 1.5 increase of VWC and are relatively frequent. These rainfall events do not appear to be damaging to ants because water simply infiltrates. On the contrary, floods from rises in the watertable are more harmful (40% of nest dies in winter due to low temperatures and, more probably, flooding; Lenoir et al. in prep). The VWC can increase to 4 or 5 times the normal values. Floods usually push the VWC up to $0.8 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$. As the water comes from the watertable, chambers which were built under a stone can retain an air pocket. The substance that joins the chamber wall particles together also increases the surface tension of surrounding water. Finally, even if some water enters a chamber, the chimney-like structure prevents water from directly inundating the deeper chambers (Figure 3). This last structure was also found in the nests of another species: *Cardiocondyla batesii* (Heinze et al. 2006).

The specific conditions required by the ants to nest show them to be good bioindicator organisms. In a study comparing various insects groups as potential bioindicators, Brown (1997) stated that ants are the most interesting group for this aim. King et al. (1998) stated that ant communities can be used as bioindicators of ecological changes. For example in Australia, changes in ant communities after a disturbance reflect changes in the other groups of invertebrates (Majer 1983; Andersen 1997). Ant communities are also used as bioindicators of disturbances from fire, grazing or logging (Neumann 1992; York 1994; Vanderwoude et al. 1997) as well as in mine site restoration (Majer et al. 1984; Majer 1985; Andersen 1997). In this study, we found that vegetation associated with *C. elegans* does not come from only one specific community; some of them are typically found near the minor channel habitats whereas others usually grow in landscapes and prairies. This ant species thus lives in a specific environment, intermediate between unstable alluvial deposits and perennial river banks. As *C. elegans* is the first ant to colonize this biotope, and for several years is the only ant present, it can be classified as a pioneer species. The presence of *C. elegans* on alluvial deposits subjected to stabilization by plants (e.g. *Populus nigra*) is an indicator of the morphological evolution of the secondary channels of the Loire River. *C. elegans* environment also matches with potential nesting sites of bird species protected by both the Bern and Bonn conventions as well as the French regulation (“directive oiseaux”). These migrating species, usually founded in the region, are principally from genera *Sterna* and *Larus*

which nest directly on sandy sediments. When the vegetation begins to develop, the variation of the sediments surface temperature decreases. When that occurs, *C. elegans* has to share space with more competitive ants like *Tetramoriun caespitum* first and secondly with *Lasius niger*.

In conclusion, the relatively stable alluvial deposits may evolve in two ways: being destroyed by rare and very high magnitude flood events or totally colonized by woody vegetation. *C. elegans* thus represents a temporary species in an evolving environment. In the Loire River World Heritage Site, *C. elegans* seems to be a good indicator of the stability of alluvial channel deposits. The presence of this ant within the secondary channels of the Loire can be linked with the morphological evolution of this river which is subjected to channel narrowing (evolution from a multiple-channel pattern to a single-channel pattern).

Further studies are needed and comparisons have to be performed between the vegetation and the sediment quality of the different fluvial environments where *C. elegans* has already been observed (Allier or Dordogne Rivers). This will allow to propose its use as a key species of all the alluvial deposits environments.

Acknowledgments

We thank the members of the “Maison de la Loire” and the “Conservatoire du Patrimoine Naturel Régional de la Région Centre” for their support and the managing of the study site. Thanks to Raymond Jégat who provided us highly valuable technician support. Our research was supported by the “Conseil régional de la Région Centre”. We thank the members of the “Laboratoire de Géologie” of University of Tours for their help in sediment analysis. Thanks to Hannah Reynolds for reviewing the English.

Tables

Table 1: Plants associated with the presence of *C. elegans* on Montlouis-sur-Loire alluvial deposits

Community	Family	Species	Specificity
Pioneer alluvial sand community from minor channel	Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i>	Dry or arid areas
	Oenotheraceae	<i>Oenothera biennis</i>	Dry areas with sandy alluvial deposits
	Plantaginaceae	<i>Plantago scabra</i>	Dry areas
Mesophil grazed prairies	Apiaceae	<i>Eryngium campestre</i>	Dry or arid areas with soil composed by coarse gravel and limestone
Dominant <i>Sedum</i> spp. plur. lawns	Crassulaceae	<i>Sedum album</i>	Dry areas
Common plants	Caryophyllaceae	<i>Saponaria officinalis</i>	Hot and dry sandy areas
	Clusiaceae	<i>Hypericum perforatum</i>	Dry areas
	Salicaceae	<i>Populus nigra</i>	Near water in soil made with gravels

Figure Captions

Figure 1: Location of the study site. Alluvial deposits of the Loire River at Montlouis-sur-Loire (Indre et Loire, France, 0°50'41.24" E; 47°23'33.92" N). Aerial view from DIREN CENTRE, September 2002.

Figure 2: Depth of the *C. elegans* nest chambers according to the rank of the chamber from the surface. N=27 nests.

Figure 3: Sagittal section of a *C. elegans* chimney-like construction preventing water from flooding deeper chambers

Figure 4: Grain size of the Montlouis-sur-Loire fluvial sediments at the location of *C. elegans* nests. Each point is represented by relative proportions of sand, gravel and coarse gravel. The base of the triangle represents coarse gravel, left side the sand and the right side the gravels.

Figure 5: Temperature of the sediments: A) from the beginning of the summer 2004 to the end of the winter 2006; B) Close-up on the hottest period of the summer 2004, arrows show the delay between the hottest points in the upper and deeper parts of the sediments. C) Daily temperature differences of the soil from 0.2 m to 0.7 m deep. N=581 for each depth.

Figure 6: Sediments volumetric water content: A) from the summer 2004, through the winter period (cold weather and flood) of 2004, to the winter of 2005. B) Close-up on 2 rainy events of August 2004. C) Close-up on the first flood of 2005. Arrows show the delay of VWC increase between the upper and deeper parts of the deposits.

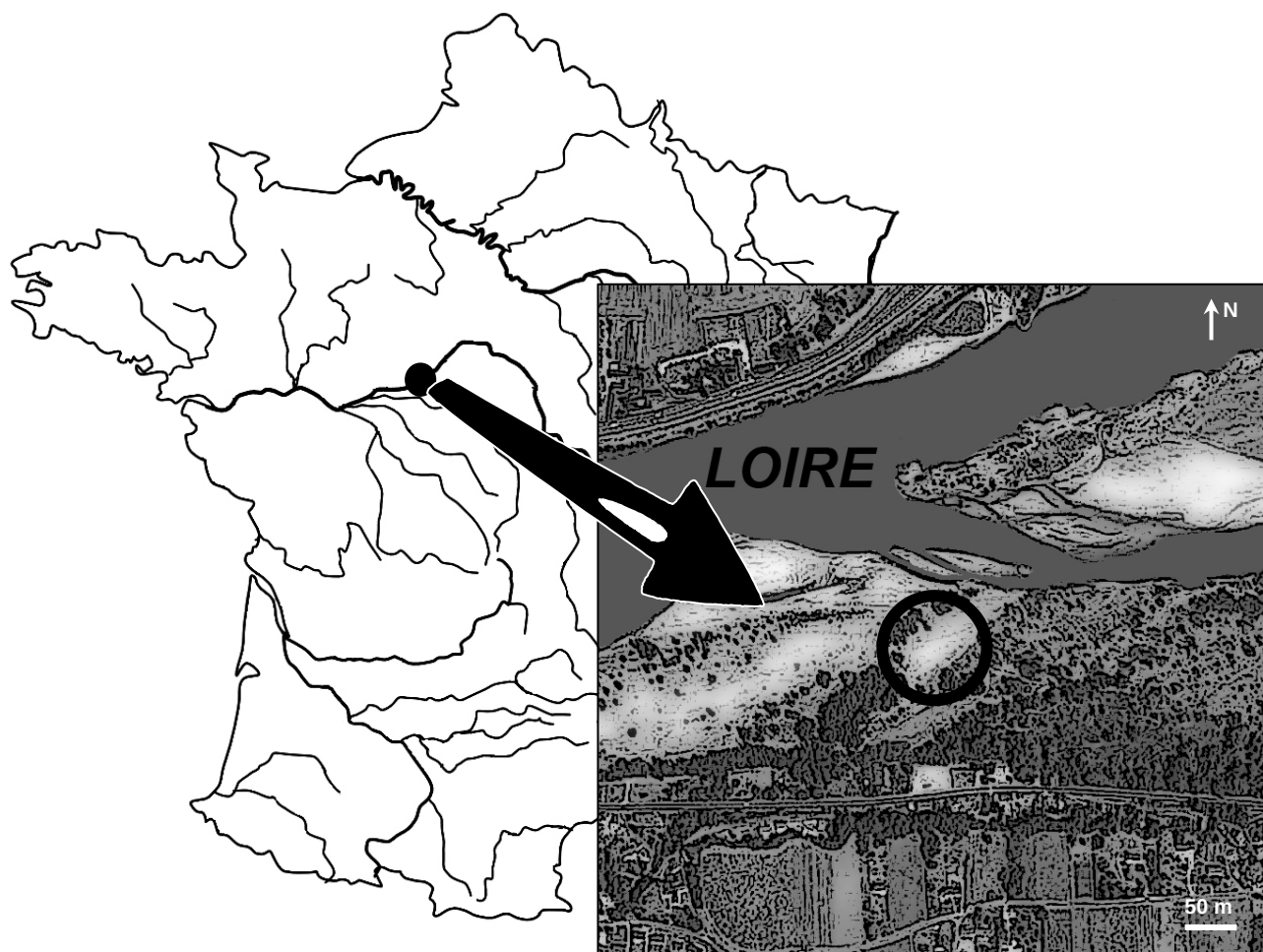


Figure 1

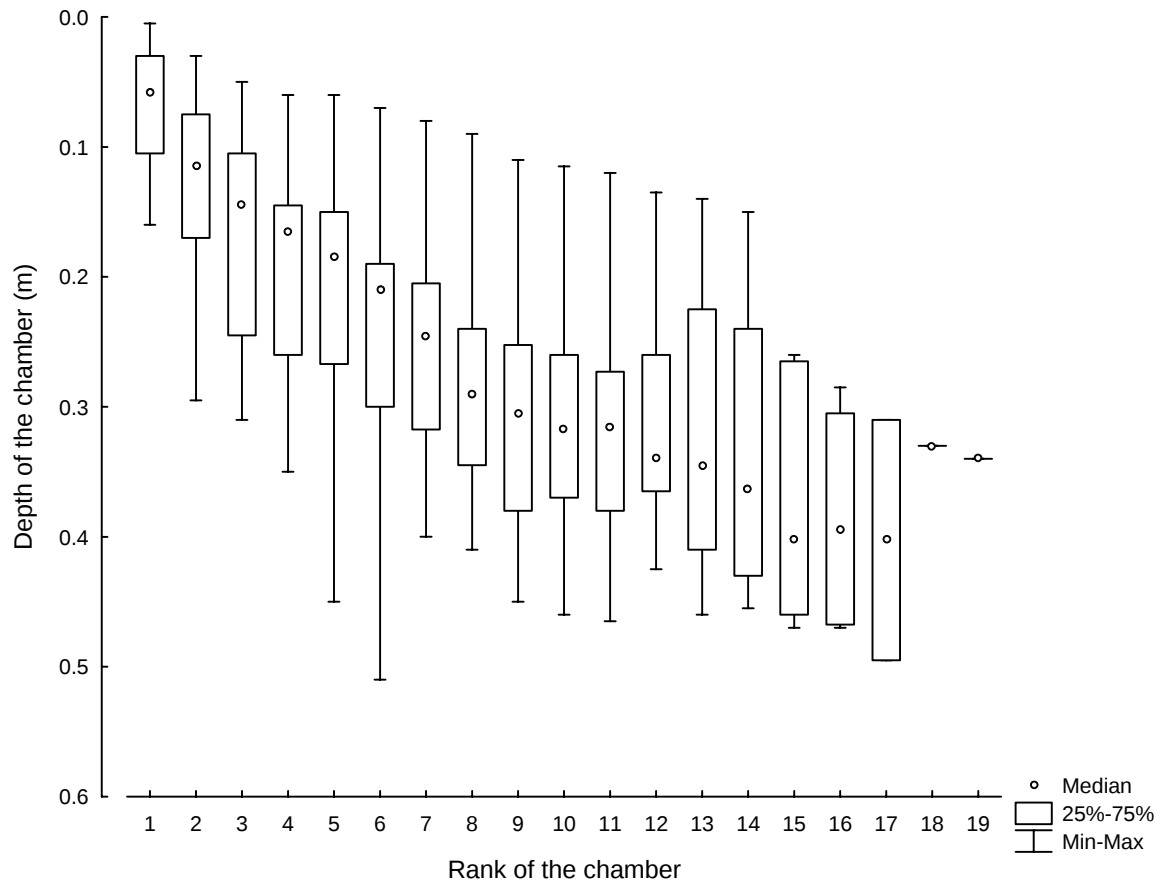


Figure 2

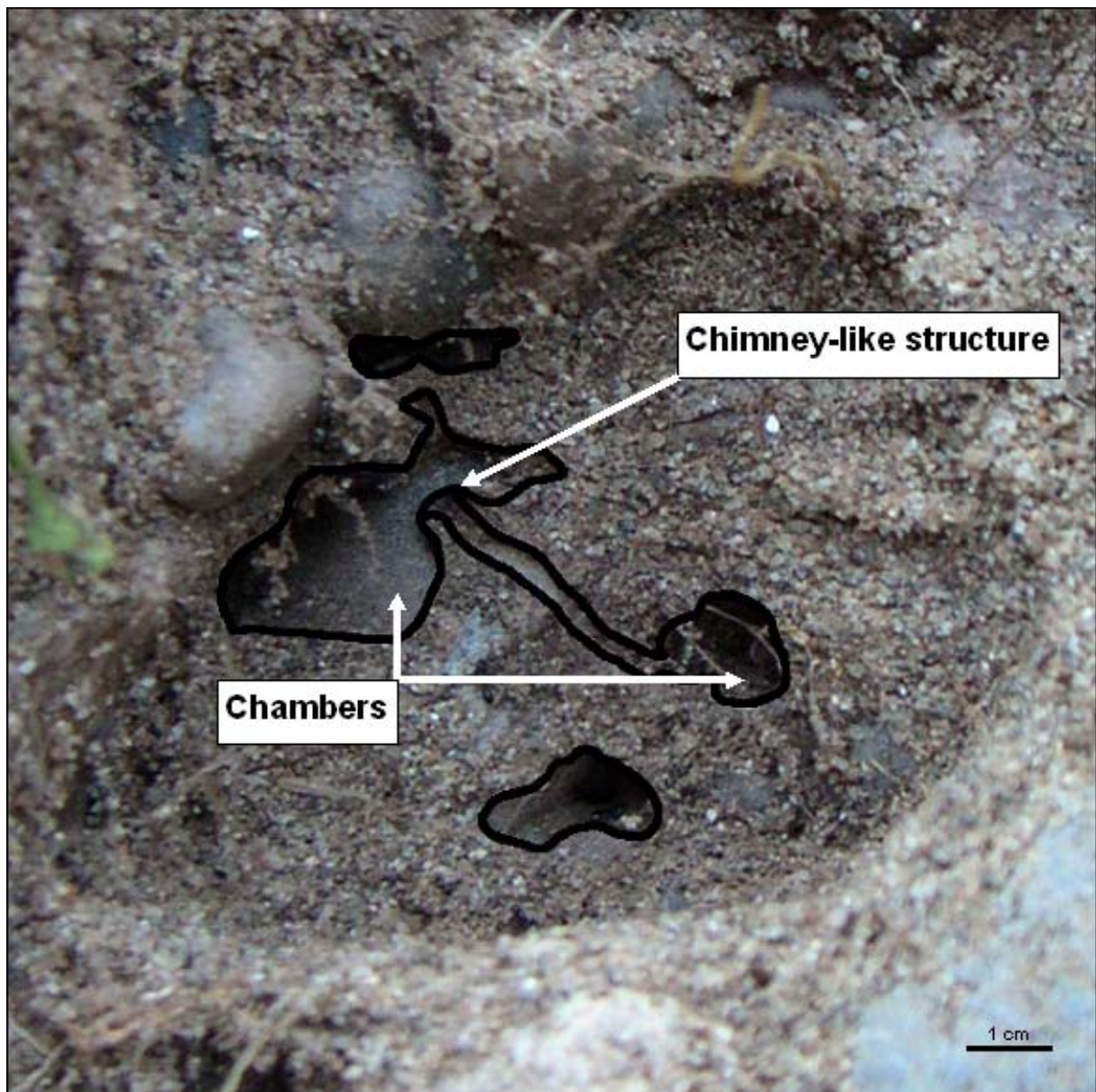


Figure 3

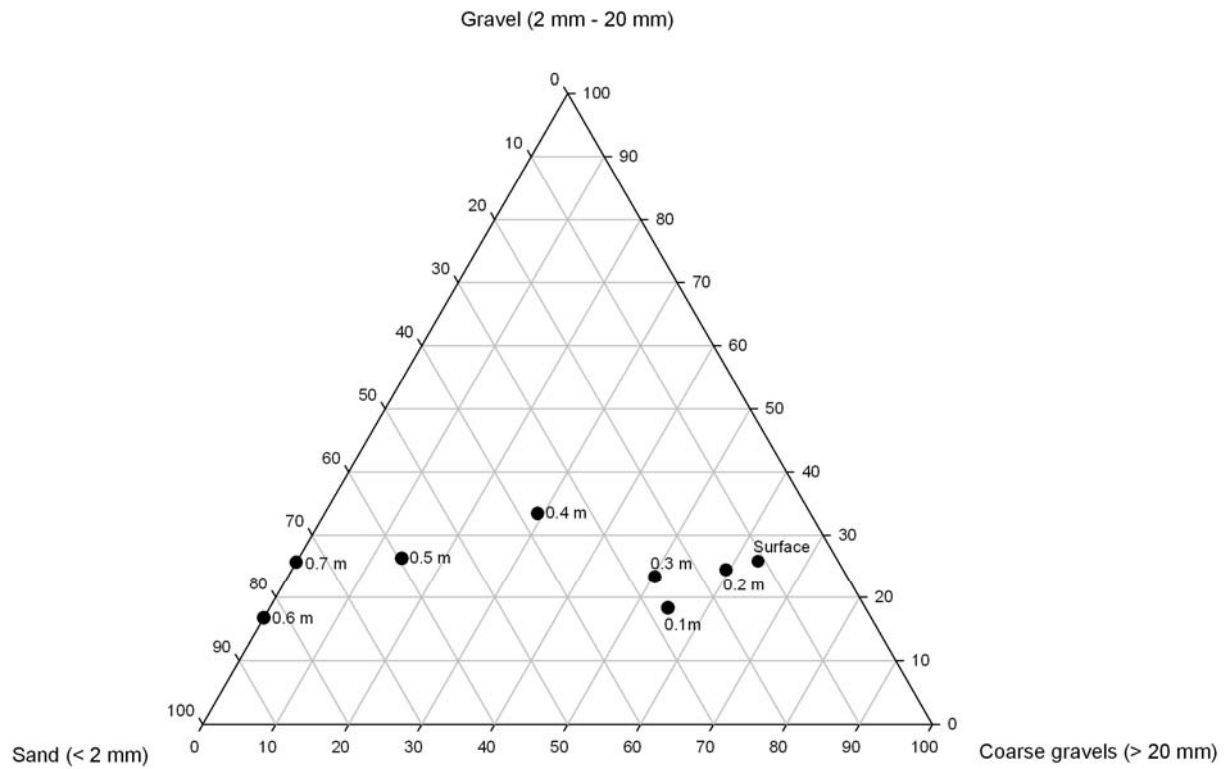


Figure 4

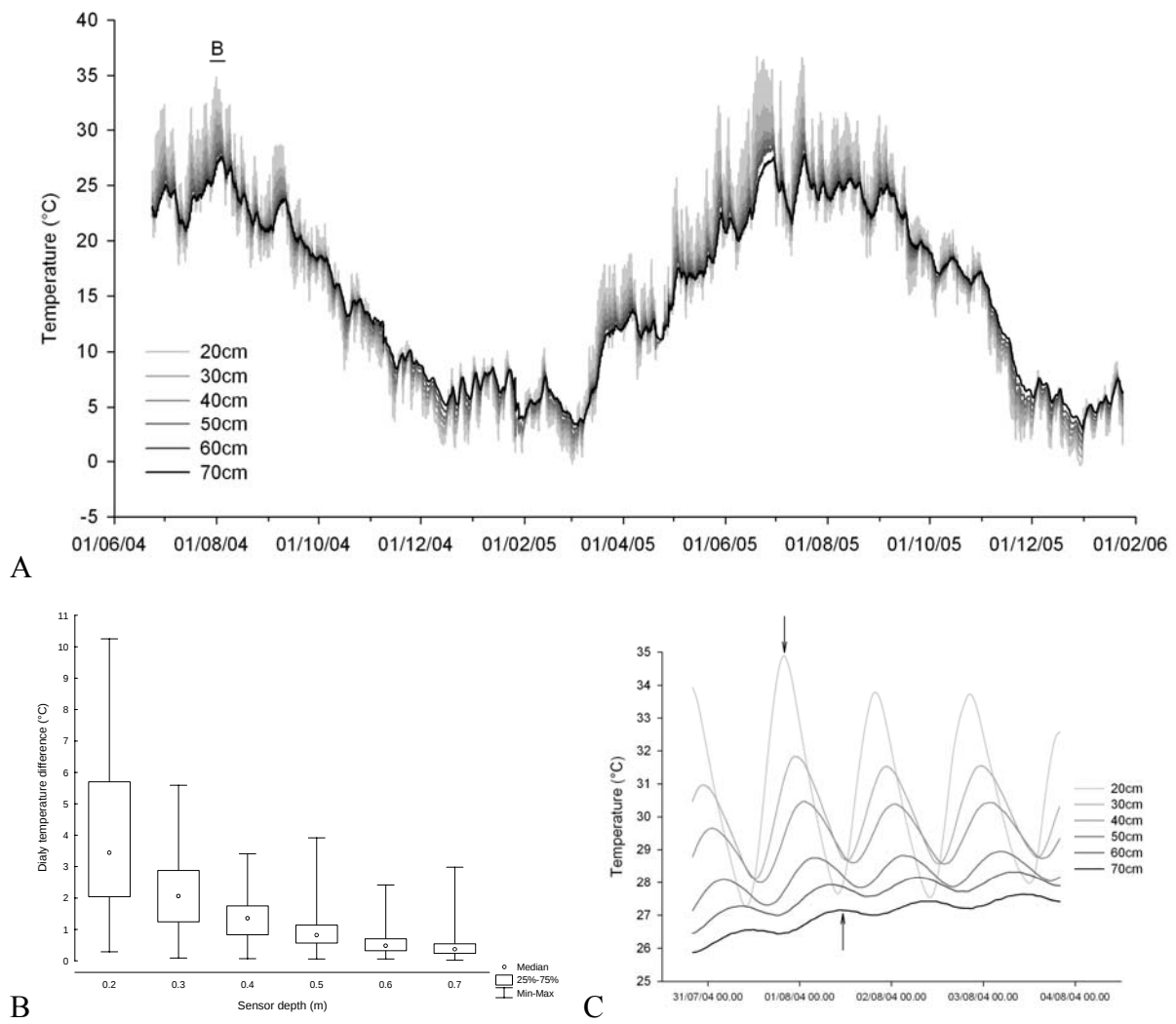


Figure 5

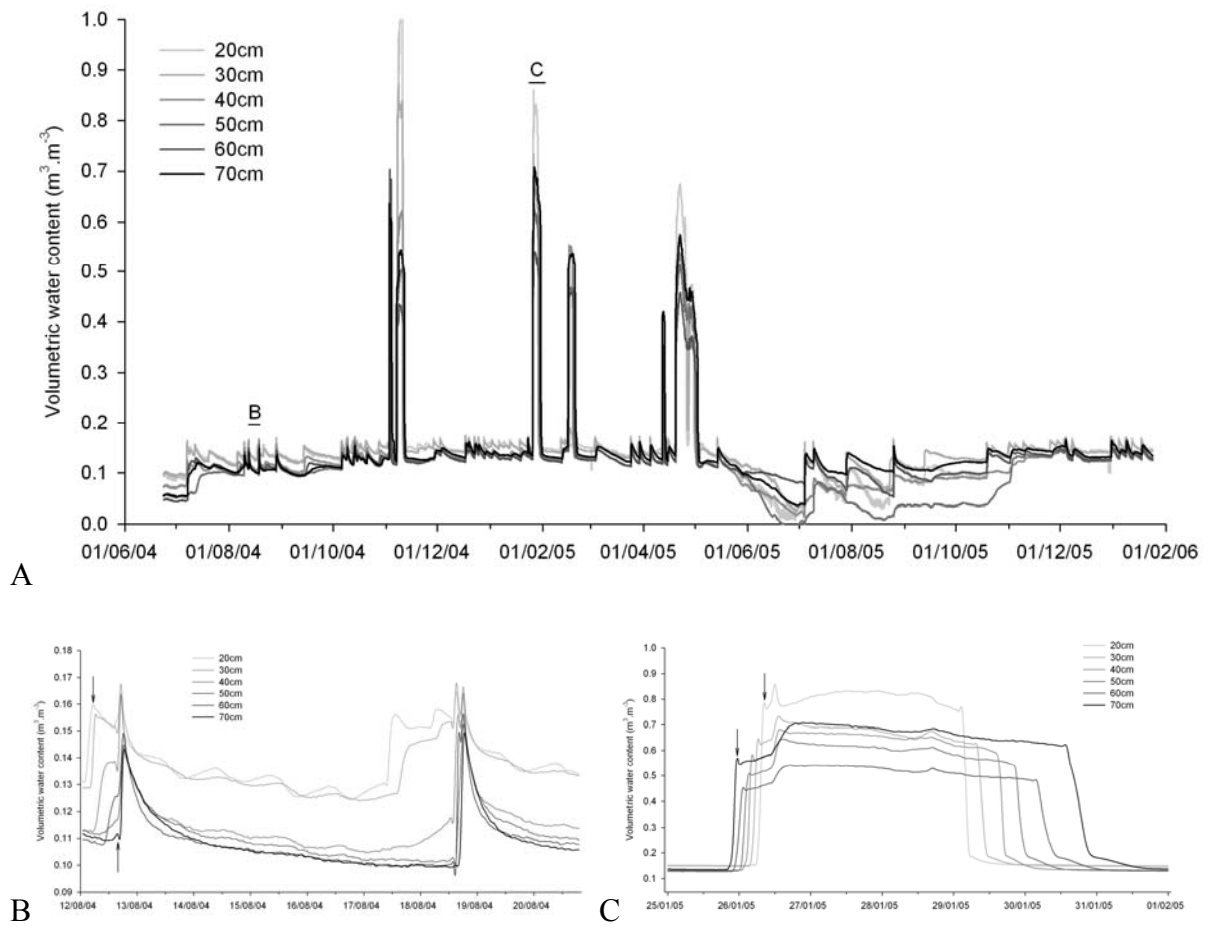


Figure 6

References

- Andersen AN (1997) Ants as indicators of restoration success following mining: a functional group approach. In: Hale P and Lamb D (eds) Conservation outside nature reserves. Centre for Conservation Biology, University of Queensland, Queensland, Australia, p 319-325
- Anderson C, Theraulaz G and Deneubourg J-L (2002) Self-assemblages in insect societies. *Insectes Sociaux* 49:99-110
- Bernard F (1968) Faune de l'Europe et du bassin méditerranéen, Masson et Cie, Paris
- Brown KS (1997) Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: insects as indicators for conservation monitoring. *Journal of Insect Conservation* 1:25-42
- Bujok B, Kleinhenz M, Fuchs S and Tautz J (2002) Hot spots in the bee hive. *Naturwissenschaften* 89:299-301
- Bunte K and Abt SR (2001) Sampling surface and subsurface particle-size distributions in wadable gravel and cobble bed streams for analyses in sediment transport, hydraulics, and streambed monitoring. RMRS - United States Department of Agriculture
- Buschinger A (1973) The role of diurnal temperature rhythms in brood development of ants of the tribe Leptothoracini (Hymenoptera; Formicidae). In: Wieser W (ed) Effects of temperature on ectothermic organisms. Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New-York
- Cornier T (2002) La végétation alluviale de la Loire entre le Charolais et l'Anjou : essai de modélisation de l'hydrosystème. Sciences de la vie, Université de Tours
- Fahrenholz L, Lamprecht I and Schricker B (1989) Thermal investigations of a honey bee colony: thermoregulation of the hive during summer and winter and heat production of members of different bee castes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 159:551-560
- Fellendorf M, Mohra C and Paxton RJ (2004) Devasting effects of river flooding to the ground-nesting bee, *Andrena vaga* (Hymenoptera: Andrenidae), and its associated fauna. *Journal of Insect Conservation* 8:311-312
- Folk RL (1974) Petrology of sedimentary rocks. Hemphill Publishing compagny, Austin
- Griffiths JC (1967) Scientific method in analysis of sediments. McGraw-Hill Book Compagny, New-York
- Haight K (2006) Defensiveness of the fire ant, *Solenopsis invicta*, is increased during colony rafting. *Insectes Sociaux* 53:32-36

- Heinze J, Cremer S, Eckl N and Schrempf A (2006) Stealthy invaders: the biology of *Cardiocondyla* tramp ants. *Insectes Sociaux* 53:1-7
- Hozumi S, Yamane S, Miyano S, Mateus S and Zucchi R (2005) Diel changes of temperature in the nests of two *Polybia* species, *P. paulista* and *P. occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae) in the subtropical climate. *Journal of Ethology* 23:153-159
- Jones JC, Myerscough MR, Graham S and Oldroyd BP (2004) Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science* 305:402-404
- King JR, Andersen AN and Cutter AD (1998) Ants as bioindicators of habitat disturbance: validation of the functional group model for Australia's humid tropics. *Biodiversity and Conservation* 7:1627-1638
- Klingner R, Richter K, Schmolz E and Keller B (2005) The role of moisture in the nest thermoregulation of social wasps. *Naturwissenschaften* 92:427-430
- Kronenberg F and Heller HC (1982) Colonial thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 148:65-76
- Lenoir JC, Dangles O, Lenoir A, Jugé P and Mercier J-L (in prep) Ant colony establishment, mortality and spacing patterns under flood disturbance.
- Majer JD (1983) Ants: bio-indicators of minesite rehabilitation, land-use, and land conservation. *Engineering Management* 7:375-385
- Majer JD (1985) Recolonization by ants of rehabilitated mineral sand mines on North Stradbroke Island, Queensland, with particular reference to seed removal. *Australian Journal of Ecology* 10:31-48
- Majer JD, Day JE, Kabay ED and Perriman WS (1984) Recolonization by ants in bauxite mines rehabilitated by a number of different methods. *Journal of Applied Ecology* 21:355-375
- Maschwitz U and Moog J (2000) Communal peeing: a new mode of flood control in ants. *Naturwissenschaften* 87:563-565
- Mikheyev AS and Tschinkel WR (2004) Nest architecture of the ant *Formica pallidefulva*: structure, costs and rules of excavation. *Insectes Sociaux* 51:30-36
- Neumann FG (1992) Responses of foraging ant populations to high intensity wildfire, salvage logging and natural regeneration processes in *Eucalyptus regnans* regrowth forest of the Victorian central highlands. *Australian Forestry* 55:29-38
- Nielsen MG (1997) Nesting biology of the mangrove mud-nesting ant *Polyrhachis sokolova* Forel (Hymenoptera, Formicidae) in northern Australia. *Insectes Sociaux* 44:15-21

- Nielsen MG, Christian K, Henriksen PG and Birkmose D (2006) Respiration by mangrove ants *Camponotus anderseni* during nest submersion associated with tidal inundation in Northern Australia. *Physiological Entomology*:In press
- O'Donnell S and Foster RL (2001) Thresholds of response in nest thermoregulation by worker bumble bees, *Bombus bifarius nearcticus* (Hymenoptera: Apidae). *Ethology* 107:387-399
- Plateaux L (1970) Extrait sur le polymorphisme social de la fourmis *Leptothorax nylanderii* (Förster). I. - Morphologie et biologie comparée des castes. *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et biologie animale* 12:25-478
- Potts SG and Willmer P (1997) Abiotic and biotic factors influencing nest-site selection by *Halictus rubicundus*: a ground nesting halictine bee. *Ecological Entomology* 22:319-328
- Rodrigues S, Bréhéret JG, Macaire JJ, Moatar F, Nistoran D and Jugé P (2006) Flow and sediment dynamics in the vegetated secondary channels of an anabranching river: the Loire River (France). *Sedimentary Geology* 186:89-109
- Rosengren R, Fortelius W, Lindstroem K and Luther A (1987) Phenology and causation of nest heating and thermoregulation in red wood ants of the *Formica rufa* group studied in coniferous forest habitats in southern Finland. *Annales Zoologici Fennici* 24:147-155
- Starks PT and Gilley DC (1999) Heat shielding: a novel method of colonial thermoregulation in honey bees. *Naturwissenschaften* 86:438-440
- Tschinkel WR (1987) Seasonal life history and nest architecture of a winter-active ant, *Prenolepis imparis*. *Insectes Sociaux* 34:143-164
- Tschinkel WR (1998) Sociometry and sociogenesis of colonies of the harvester ant, *Pogonomyrmex badius*: worker characteristics in relation to colony size and season. *Insectes Sociaux* 45:385-410
- Tschinkel WR (1999) Sociometry and sociogenesis of colonies of the harvester ant, *Pogonomyrmex badius*: distribution of workers, brood and seeds within the nest in relation to colony size and season. *Ecological Entomology* 24:222-237
- Tschinkel WR (2004) Nest architecture of the Florida harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. *Journal of Insect Science* 4:19pp
- Vanderwoude C, Andersen AN and House APN (1997) Community organisation, biogeography, and seasonality of ants in an open forest of south-eastern Queensland. *Australian Journal of Zoology* 45:523-537

- Vinson SB and Sorensen AA (1986) Imported fire ants: life history and impact, Austin
- Wilson EO (1971) The insect societies. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusset
- York A (1994) The long-term effects of fire on forest ant communities: management implications for the conservation of biodiversity. *Memoirs of the Queensland Museum* 36:231-239

Distribution spatiale et survie de *C. elegans*

Article 2. Influence de la crue sur l'établissement, la mortalité et la répartition spatiale des nids.

Résumé

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre comment s'organisent les populations de *C. elegans* et quel est l'impact des crues sur ces dernières. Pour cela, nous avons suivi durant 2 années successives une population vivant sur une des grèves fixées de la rive gauche de la Loire, à la hauteur de Montlouis-sur-Loire. La zone d'étude était de 318 m² et la densité de nids retrouvée sur cette zone est restée la même d'une année sur l'autre : environ 1 nid/m². La crue hivernale a eu pour effet de détruire 40% des nids. Cependant, ce n'est pas la destruction même de l'habitat qui est responsable de cette mortalité. Les nids disparus se distribuent au hasard sur l'ensemble de la zone d'étude. Cela signifie que les nids disparus sont probablement ceux dont la structure n'a pas résisté aux inondations. De plus, nous nous sommes aperçus que tous les nids ne reprenaient pas leur activité en même temps. Nous ne pouvons cependant pas encore dire quels sont les facteurs qui pourraient expliquer ce phénomène, mais on peut émettre l'hypothèse que les individus de la colonie auraient plus ou moins de difficultés à émerger de nouveau au printemps. Les fondations de nouveaux nids sont visibles dès la reprise d'activité des nids après la crue, et l'emplacement de ces nouveaux nids ne se fait pas au hasard. En effet, la population apparaît distribuée de façon dispersée. Cela signifie que chaque nid optimise la distance qui le sépare de ses proches voisins. L'hypothèse principale expliquant une telle distribution serait que les nids déjà établis auraient un fort impact sur le succès des nouvelles fondations qui les entourent.



Jean-Christophe Lenoir, Olivier Dangles, Alain Lenoir, Philippe Jugé et Jean-Luc Mercier. Ant colony establishment, mortality and spacing patterns under flood disturbance. (*en préparation*).

Ant colony establishment, mortality and spacing patterns under flood disturbance

Jean-Christophe Lenoir¹, Olivier Dangles², Alain Lenoir¹, Philippe Jugé³ and Jean-Luc Mercier¹

¹ *Université François Rabelais, Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, 37200 Tours, France.*

² *IRD (UR072), c/o CNRS LEGS, BP1, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.*

³ *Association pour le Développement de l’Enseignement Supérieur en Val de Vienne, 11 quai Danton, 37500 Chinon, France.*

Corresponding author: Jean-Christophe Lenoir

jean-christophe.lenoir@etu.univ-tours.fr

Abstract

To evaluate the relative effect of flood disturbance and intra-specific competition in *Cardiocondyla elegans* population, we performed a sequential determination of the spatial repartition of colonies, nesting on the alluvial deposits of the Loire River. We founded that 40% of the nests died during the flood event. The death of the nests was not directly due to the flood destroying the sandy deposits but more probably because of flooding of the badly constructed chambers and/or ant asphyxiation. Nonetheless, *C. elegans* generally attains a density of 1 nest per m² in its riverine habitat during the summer. New nests are founded by winged females who disperse from the surviving nests. These new nests appear regularly spaced from the established ones (already in activity or still cryptic at the founding event). These results are consistent with the density-dependent spacing theory. Whereas the flood does not influence the population spacing but the population surviving, intra-specific competition is the main factor that leads the population to regular distribution.

Introduction

Spatial pattern in animal populations results from a set of processes governing the pattern of colonization and mediates intra-specific interactions, such as density-dependent mortality and competition (Begon et al. 2006). Many sessile organisms such as plant, algae or corals are known to compete strongly for exclusive space (Barnes and Rothery 1996; Matsinos and Troumbis 2002; Tanner 1997) and their non-random dispersion has been related to initial habitat choice or subsequent mortality (Ryti and Case 1986). Ant colonies are interesting systems for asking questions about spatial pattern formation in sessile animals because once established, they remain at the same location and survive over several years. Several studies on spatial distribution of nests were conducted on desert harvester ant *Pogonomyrmex* (Gordon 1993; Gordon and Kulig 1996) or *Messor* (Pfennig 1995; Warburg and Steinberger 1997). All these studies showed that spacing is increasingly regular as density increases therefore agreeing with the simulation model of neighbourhood competition proposed by Ryti & Case (1992). The authors modelled “two kinds of competition: mortality of juveniles that found a nest near established colonies and competition between established colonies through local crowding”. In this model, regular dispersion involves populations where competition between established colonies is weak, and established colonies interfere on young queen founding assay. The authors then determined that spatial distribution is density-dependent: colonies exhibit more regular spacing as population size increases.

A major disturbance like an inundation must have important consequences on the population. These consequences have been rarely studied in ants as well as in other insects. Fellendorf et al. (2004) and Potts and Willmer (1997) indicate the ravaging effect of the flood for another model of “sessile” insects: the ground-nesting bees *Andrena vaga* and *Halictus rubicundus*. Here, we studied the ant, *Cardiocondyla elegans*, nesting in alluvial deposits of the Loire River which are submitted each year to flooding events during the winter period. Nests recover activity some time after a flooding event: workers rebuild nests and begin foraging. *C. elegans* is a pioneer species in this kind of environment and can remain the only present species of ant during several years. This ant species has a very particular reproductive system: winged and fecundated females overwinter inside the nest and in spring have dispersal flights. When they are back on the ground, they shed their wings and prospect for a good place to found a new nest. Colonies grow until July, increasing their foraging activity. From July to September, the most developed colonies produce wingless male and winged female sexuals. Sexuals will be exchanged between neighbouring nests, especially winged females carried by workers, to avoid inbreeding (Lenoir et al. submitted in Molecular

Ecology). In autumn, when conditions deteriorate (decreasing temperature), males die and several females take their chance to fly away but the majority of them stay in the nests, waiting for the next spring.

The aim of this study is to determine the impact of flood and intra-specific competition on the survival and the spatial distribution of *C. elegans* population. For this purpose, we conducted a field study, following the evolution of nests repartition during two successive years, separated by the annual floods of the Loire River. Whereas usual spacing investigation involve only one data collection per year (Gordon and Kulig 1996), we choose to measure the spacing pattern in two phases: “early” after the flood event to determine its effect on spatial distribution, and “late” at the end of the activity period to have an idea of the intra-specific competition for space and of the flood impact on nests survival.

Material and methods

Study model

Cardiocondyla elegans Emery, 1869, is a small (c. 2.3 mm long) myrmicine ant living in sandy and moist soils. This species is distributed to the North and West of the Mediterranean Sea (Spain, South of France, Italy, Greece, Bulgaria, Caucasian, Turkistan, and Palestine) and has been recently discovered in the Loire valley (Lafréchoux et al. 1999), its northeast range limit. *C. elegans* is only found in river coarse alluvial deposits that resist annual floods without reorganization of the soil structure. Foundations are semi-claustral (*personal observations*) and lead to monogynous and independent nests. A nest of *C. elegans* is a spatial unit composed of a single vertical pipe of about 1 mm in diameter connecting 15 to 20 chambers. The nest can be held in a cylinder of soil of 10 cm in diameter and 60 cm in depth. The nests have never been founded horizontally connected among each other in the soil.

Flood

Data of the Loire River altitude were collected from the website of the Direction Régionale de l’Environnement, station of Tours (http://www2.centre.environnement.gouv.fr/cotes_loire/web/infostation.asp?station=15), and modified to fit with the altitude of the studied area at Montlouis-sur-Loire (15 Kms upstream from Tours).

Nest survey

During two successive years 2004 and 2005, we mapped the evolution of a nesting population of *C. elegans* in the side deposits of the Loire River at Montlouis-sur-Loire (Indre et Loire, France, X: 487392.365; Y: 266967.198 (m Lambert II NTF); Z: 50.32 (mIGN69 NGF) (= 0°50'41.24" E; 47°23'33.92" N).

A homogeneous (in terms of vegetation and soil texture) area of 318 m² was prospected and all the nests of *C. elegans* were located. Some of the nests are very easy to detect when workers show important foraging and nest construction activities: the entrance of the nest is thus surrounded by a crater of very fine sand (Figure 1). On the contrary, some other young nests are more difficult to detect and are only represented by a hole of 1 mm in diameter. In this case we decided to record this entrance as a nest when more than 2 ants were observed entering into it. Nest prospecting was conducted during the five days before collecting data.

The exact location of each nest was recorded with a Geodimeter (GEODIMETER SYSTEM 440, Trimble France) which measures the coordinates of a pointed nest in the Lambert II NTF world references with a 1 cm precision. Nests were sampled at three different periods. The first sampling (early nests) was performed at least 45 days after the last flood event, between May 15th and June 15th. Forty-five days later, a second sampling was conducted and completed by a third one at the end of the reproductive period of the ants, between September 15th and October 15th. Data from these two last samplings were pooled and analysed as late nests. All mapping calculations and drawings were performed using Surfer Version 8.01 (Golden Software, Inc. Colorado).

Spatial analyses of nest location

Spatial randomness

In order to determine whether the pattern of ant nests was random, aggregated or regular over the study area, we used the pair correlation function $G(r)$ (Diggle 1983; Ripley 1981). $G(r)$ gives the expected number of points at a distance r from an arbitrary point, divided by the intensity (number of points per unit area) λ of the pattern. Significance of distribution pattern (random, aggregated or regular) was evaluated by comparing the observed data with Monte-Carlo envelopes from the analysis of 1000 simulations of the null model of complete spatial randomness (CSR). This model assumes that the intensity of the point pattern is constant over the study region (i.e. any point of the pattern has an equal probability of occurring at any position) and that the probability of finding k points in an area W follows a Poisson distribution with mean λW . A $G(r)$ positioned inside the upper and lower CSR

envelopes signifies a random distribution of the nests, whereas an excess of short or long distance neighbours indicates clustering or regularity, respectively.

Marked point pattern analysis

To investigate the spatial interaction between the locations of different types of nests, we created a marked point pattern in which the nests carry marks determining their type (missing, cryptic: present in the soil but without surface activity, emerged and newly founded). A cross-type nearest neighbour distance distribution function $J_{ij}(r)$ was calculated to investigate whether the different patterns of nests are independent or display attraction or repulsion (Ripley 1981). Significance was evaluated by comparing the observed data with envelopes from the analysis of 1000 simulations of the null model of random labeling (RL). This model involves repeated simulations using the fixed location of point pattern of both short and long hairs, but randomly assigning length labels (Bailey and Gatrell 1995). A $J_{ij}(r)$ positioned inside the upper and lower RL envelopes signifies independent distributions of long and short hairs, whereas an excess of short or long distances between nearest neighbours indicates a repulsion or attraction of hairs having the same mark, respectively.

All analyses included a correction of edge effects arising from the unobservability of points of the random pattern outside the study area. We used the border method estimator (Ripley 1988), which can be computed for an area of polygonal shape. All spatial analyses were performed using the "spatial stat" package of R software (R Development Core Team).

Results

Dynamics of the population

Between 2004 and 2005, nests were flooded four times. The first and the second flood were of short amplitude and duration (10 cm and 47 cm respectively during 2 days each). The third flood was the most important with 141 cm of water over the nests soil surface for 5 days. Finally, the last flood was of low amplitude with 7 cm of water lasting 2 days (Figure 2). Between each flood events no foraging activity was observed. In 2004, the last flooding period ended at the beginning of February. In 2005, water finally subsided on April 30th. Then, "2005" colonies had three months of delay for their establishment compared to the previous year. Nevertheless, a similar number of nests was found at the beginning of summer (early nests: 127 in 2004 vs. 109 in 2005) (Figure 2 and Figure 3). The dynamic and the final number of nests are the same in the two successive years (Figure 2).

In Figure 3, we show the dynamics of the nests during the studied period. To the 127 nests revealed during the first sampling of 2004 203 additional late nests appeared through the summer. The final number of nest in 2004 is thus 330. The flood period had an important impact on the survival of these nest: 53 of the early and 87 of the late nests of 2004 died because of the flood. That means flood causes 42% of mortality on the 2004 *C. elegans* population. Fifty three of the 127 early nests of 2004 (42%) died during the flood and the same proportion (43%) of late nests of 2004 also died during this event. The activity duration before the flood does not seem to be linked to the death rate. Fifty eight percent of nests survived over the winter and flood periods. Then nests that appear early in 2004 are not all early in 2005. Twenty six of the 74 surviving early nests and 35 of the 116 surviving late nests of 2004 recovered activity before the first sampling period of 2005. During this data collection, 48 new founded nests (44%) were founded. In the second sampling event of 2005, 48 of the early nests of 2004 and 81 of late nests of 2004 were recovered. Ninety eight new “late” founded nests (43%) were also located during this last data collection. Thus, even if they were early or late in 2004, 30% to 35% of the surviving nests recover activity “early” in 2005. The other surviving nests take longer to begin their activity. The foundation rate of the new nests looks constant through the whole season. As the studied area was 318 m², the nest density was the same for the two years with 1.05 nest/m².

Spatial distribution at the end of the activity period

The point pattern of the nests is represented in Figure 4 for 2004 and 2005. The nests at the end of the activity period look homogeneously distributed within the studied area. The spatial analyses of the nests in 2004, as well as in 2005, indicate the regular distribution of the nests closer than 70 cm (Figure 5). This is consistent with a density of about 1 nest/m².

Impact of flood disturbance on spatial structure

The analysis of the spatial distribution of the missing nests indicates that these nests are randomly distributed (Figure 6). The flood has neither local impact on the death of the nests nor on the emergence of the nests. Indeed, the emergence of the earliest nests appears to be randomly ruled in 2004 as well as in 2005 (Figure 7).

Impact of intra-specific competition on spatial structure

To figure the foundation conditions of the new nests we analysed the interactions between them and the missing nests (Figure 8). They distribute independently from the

missing nests. This means that the new founded nests do not pay attention to the nests that have been present during the preceding year and who disappear during the flooding period. The competition for space was detected by analysing the interaction between the new founded nests, early in 2005 as well as later in the same year, and the other nests. The “early” new founded nests distribute regularly from the other nests: already active on the field or the cryptic ones (present in the soil but still in hibernation) (Figure 9A). The “late” new founded nests also circumvent all the already present nests on the field. They distribute regularly from them (Figure 9B).

Discussion

Disentangling the factors influencing the distribution in *C. elegans*, we proceeded a sequential determination of the spatial repartition of the nests. The chosen population has to handle every year the annual flood of the close Loire River. Nevertheless, each year this population develops a great number of nests. We tried to determine the impact of both the flood and the intra-specific competition on the nests distribution.

Impact of flood disturbance on spatial structure

We studied for two successive years (2004 and 2005), and determined that 40% of the nests disappeared between these two years. Two hypotheses can explain this “disappearance”. The “missing nests” (1) may have moved location or (2) have been killed, drowned because of the flood. The potential moving of a nest must leave at the old location a nest without any activity whatever the time the moving takes place (in the spring after digging activity, during the reproductive period as well as late in autumn). All the nests located during this study maintained activity (digging and foraging) from their emergence to the last data collection. The first hypothesis is not well supported here. The second hypothesis of death of the missing nests due to major events like low temperature in the winter (down to 0.35°C at 70cm of depth, *personal data*) and flood (more than 10 days under water and up to 1.41 meters of water over the surface) looks more appropriate. Some others Hymenoptera species can be affected by punctual river flooding. This is a devastating situation for ground-nesting bees *Andrena vaga* (Fellendorf *et al.* 2004) and *Halictus rubicundus* (Potts and Willmer 1997): all immatures in brood cells died. *C. elegans* ants remain in their nests during the flood, and no activity was detected between two flood events. Other ant species exhibit particular behaviour in case of flooding. For example, in *Solenopsis invicta*, the whole colony (workers, queen and

brood) form a mass of ant that floats on the water's surface (Anderson et al. 2002; Haight 2006; Vinson and Sorensen 1986), waiting for the water to retire.

Floods provide a death rate of 40% on the ant population. Is this mortality due to local perturbations of the soil structure and thus destruction of the habitat, or drowning the nest chambers? The distribution of the "missing nests" is random (Figure 6). Local rearrangement of the soil structure must show local aggregation of the missing nests and the area where *C. elegans* live are quite stable, sediment reworking can occur only during high magnitude flood events (Rodrigues et al. 2006). We hypothesize that the nest architecture can be the most important factor influencing the ants' survival. Well placed and well built chambers can increase the chance to catch an air bubble and thus provide surviving spaces. The last factor that can play a role in the nest mortality is the duration of the flood: caught air pockets can become a fatal anoxic microhabitat if the flood remains too long (Boomsma and Isaaks 1982; Hoback and Stanley 2001; Nielsen 1997; Nielsen et al. 2003; Nielsen et al. 2006).

The earliest nests in 2004 are not especially also early the following year. The same was observed for the late nests (Figure 3 and Figure 4). This result confirms the random recovering of activity of the *C. elegans* colonies (Figure 7). The first nests to emerge are thus not the "older" ones and flood does not seem to influence the date of emergence of the surviving nests.

Impact of intra-specific competition on spatial structure

Forty percent of the nests founded in 2005 are new founding ones. This can appear as a huge success of the foundresses. In fact, according to the mean number of winged females founded in a *C. elegans* nest: 76.64 ± 78.15 (Lenoir et al. submitted a), the 190 surviving nests represent a potential of 14500 foundresses that may be found on the study site. Nevertheless, only 146 new founding nests developed in 2005. It means that only 0.99% of the winged females succeeded in founding a new colony. This proportion matches with the founding success evaluated in other ant species like *Pogonomyrmex barbatus* (Gordon and Kulig 1996) or *Messor pergandei* (Pfennig 1995).

The new nests do not use remaining traces of missing nests, avoiding or using the free space to establish their own colony (Figure 8). The population grows thanks to the emergence of the surviving nests, but also thanks to additional new founded nests that space regularly from all the surviving nests (emerged as well as cryptic nests) (Figure 9). Each nest tries to maximize the distance with the surrounding other nests. These results are in accordance with the model proposed by Ryti and Case (1992) where regular spacing results from

neighbourhood competition where established nests interfere with the establishment of foundress queens. One can assume that queens try to found a new nest randomly but the closer established nests (less than 70 cm for *C. elegans* according to the Figure 5) will try to kill this foundation.

Spatial distribution at the end of the activity period

Finally, the increase of the number of nests saturates the site reaching the highest density of 1 nest/m². The nests are then regularly distributed (Figure 5). This is consistent with the density-dependent spacing rule proposed by Ryti (1990) and Ryti and Case (1992). The density-dependent spacing, in which mature colonies impose a selective predation on founding queens and incipient colonies, might be a crucial source of population stability. This could be a mechanism which contributes to the maintenance of the population diversity as suggested by Levings and Franks (1982). *C. elegans* exchange sexuals between neighbour nests to avoid inbreeding (Lenoir et al. submitted b). Assuming the foundress found their nest in the close area of their mother nests, the two colonies will exchange genetically related sexuals, failing in inbreeding avoidance. Competing with too close new founded nests, established ones impose young females sexual to disperse as far as they can, decreasing chances to have a related neighbour.

Acknowledgments

We thank the members of the “Maison de la Loire” and the “Conservatoire du Patrimoine Naturel Régional de la Région Centre” for their support and the managing of the study site. We thank Xim Cerdá for helpful comments on an earlier draft of this paper. Thanks to Ian Cook and Keith Davidson for the review of the English. This work was supported by the Région Centre.

References

- Anderson C, Theraulaz G, Deneubourg J-L (2002) Self-assemblages in insect societies. *Insectes Sociaux* 49:99-110
- Bailey TC, Gatrell AC (1995) Interactive spatial data analysis. Wiley, New York, USA
- Barnes DKA, Rothery P (1996) Competition in encrusting Antarctic bryozoan assemblages: outcomes, influences and implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 196:267-284

- Boomsma JJ, Isaaks JA (1982) Effects of inundation and salt on the survival of ants in a sandy coastal plain. *Ecological Entomology*, 7, 121-130
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) *Ecology: from individuals to ecosystems*, Fourth edn. Blackwell Publishing
- Diggle PJ (1983) *Statistical analysis of spatial point patterns*, London, UK
- Fellendorf M, Mohra C, Paxton RJ (2004) Devasting effects of river flooding to the ground-nesting bee, *Andrena vaga* (Hymenoptera: Andrenidae), and its associated fauna. *Journal of Insect Conservation* 8:311-312
- Gordon DM (1993) The spatial scale of seed collection by harvester ants. *Oecologia* 95:479-487
- Gordon DM, Kulig AW (1996) Founding, foraging, and fighting: colony size and the spatial distribution of harvester ant nests. *Ecology* 77:2393-2409
- Haight K (2006) Defensiveness of the fire ant, *Solenopsis invicta*, is increased during colony rafting. *Insectes Sociaux* 53:32-36
- Hoback WW, Stanley DW (2001) Insects in hypoxia. *Journal of Insect Physiology* 47:533-542
- Lafréchoux C, Mercier J-L, Lenoir A (1999) Etude myrmécologique en Touraine. *Recherches naturalistes en Région Centre* 2:17-23
- Lenoir J-C, Rodrigues S, Lenoir A, Mercier J-L (submitted a) Nest structure in the ant *Cardiocondyla elegans* (Formicidae, Myrmicinae): how do they resist to freezing, drowning and high temperatures in alluvial deposits?
- Lenoir J-C, Schrempf A, Lenoir A, Heinze J, Mercier J-L (submitted b) Genetic structure and reproductive strategy of the ant *Cardiocondyla elegans*: strictly monogynous nests invaded by unrelated sexuals.
- Levings SC, Franks N, R. (1982) Patterns of nest dispersion in a tropical ground ant community. *Ecology* 63:338-344
- Matsinos YG, Troumbis AY (2002) Modeling competition, dispersal and effects of disturbance in the dynamics of a grassland community using a cellular automaton model. *Ecological Modelling* 149:71-83
- Nielsen MG (1997) Nesting biology of the mangrove mud-nesting ant *Polyrhachis sokolova* Forel (Hymenoptera, Formicidae) in northern Australia. *Insectes Sociaux* 44:15-21
- Nielsen MG, Christian K, Birkmose D (2003) Carbon dioxide concentrations in the nests of the mud-dwelling mangrove ant *Polyrhachis sokolova* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Australian Journal of Entomology* 42:357-362

- Nielsen MG, Christian K, Henriksen PG, Birkmose D (2006) Respiration by mangrove ants *Camponotus anderseni* during nest submersion associated with tidal inundation in Northern Australia. *Physiological Entomology*:In press
- Pfennig DW (1995) Absence of joint nesting advantage in desert seed harvester ants: evidence from a field experiment. *Animal Behaviour* 49:567-575
- Potts SG, Willmer P (1997) Abiotic and biotic factors influencing nest-site selection by *Halictus rubicundus*: a ground nesting halictine bee. *Ecological Entomology* 22:319-328
- Ripley BD (1981) *Spatial statistics*. Wiley, New York, USA
- Ripley BD (1988) *Statistical Inference For Spatial Processes*. Cambridge University Press, Cambridge
- Rodrigues S, Bréhéret JG, Macaire JJ, Moatar F, Nistoran D, Jugé P (2006) Flow and sediment dynamics in the vegetated secondary channels of an anabranching river: the Loire River (France). *Sedimentary Geology* 186:89-109
- Ryti RT (1990) Theoretical considerations of density-dependent spacing in mound building ant *Formica altipetens*. *Journal of Theoretical Biology* 147:289-301
- Ryti RT, Case TJ (1986) Overdispersion of ant colonies: a test of hypotheses. *Oecologia* 69:446-453
- Ryti RT, Case TJ (1992) The role of neighborhood competition in the spacing and diversity of ant communities. *American Naturalist* 139:355-374
- Tanner JE (1997) Interspecific competition reduces fitness in scleractinian corals. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 214:19-34
- Vinson SB, Sorensen AA (1986) *Imported fire ants: life history and impact*, Austin
- Warburg I, Steinberger Y (1997) On the spacial distribution of nests of the ants *Messor arenarius* and *Messor ebeninus*. *Journal of Arid Environments* 36:671-676

Figure list

Figure 1 Crater of fine sand created by the digging activity of *C. elegans*

Figure 2: Flooding hydrogram of the Loire River and dynamics of nests emergences for the both years 2004 and 2005. The hatched zone indicates the flooding period between 2004 and 2005.

Figure 3: Schematic population dynamics through the 2 studied years.

Figure 4: Field repartition of the nests of 2004 and 2005. Nests are represented as "early" or "late" nests depending of the time they are active in the field. Nest only detected in 2004 are identified as dead nests, and the nests only detected in 2005 are the new nests. Nests marked during the 2 successive years (surviving nests) are the survivors of the winter period. Their qualification in term of "early / late" is represented by 4 different symbols.

Figure 5: Spatial distribution of all the nests at the end of the activity period in 2004 (A) and 2005 (B). $G(r)$ represents the pattern of ant nests according to the distance of the nearest nest. Little dashed lines represent Monte-Carlo envelopes from the analysis of 1000 simulations of the null model of complete spatial randomness (CSR) follows a Poisson distribution. Full line shows the data from sampled nests.

Figure 6: Spatial distribution of the "missing nests" according to their nearest neighbour.

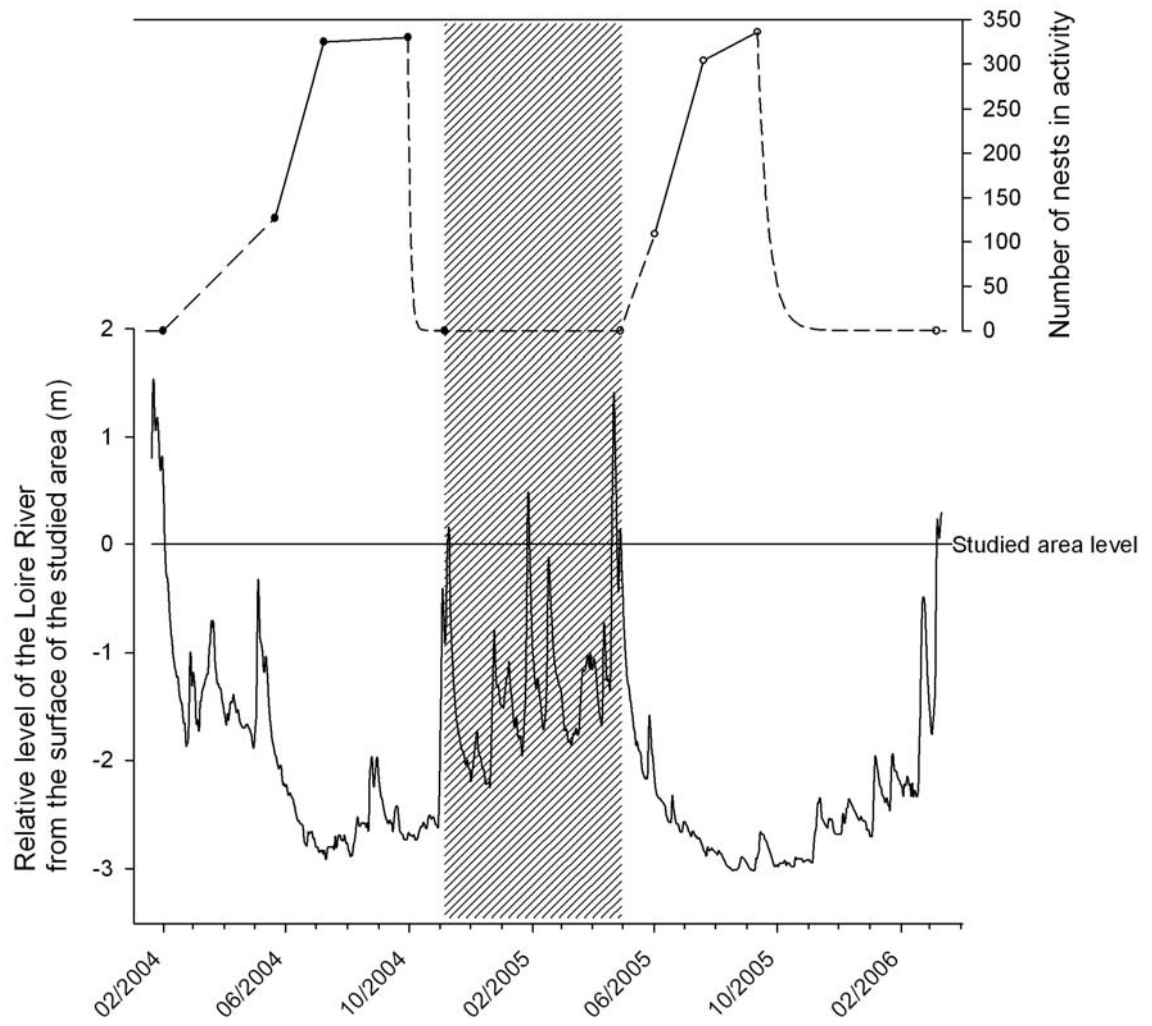
Figure 7: Pattern of emergence of all the earliest nests in 2004 (A) and 2005 (B).

Figure 8: A. Interaction between the distribution of the missing nests (little dashed lines) and the new founding nests (full line).

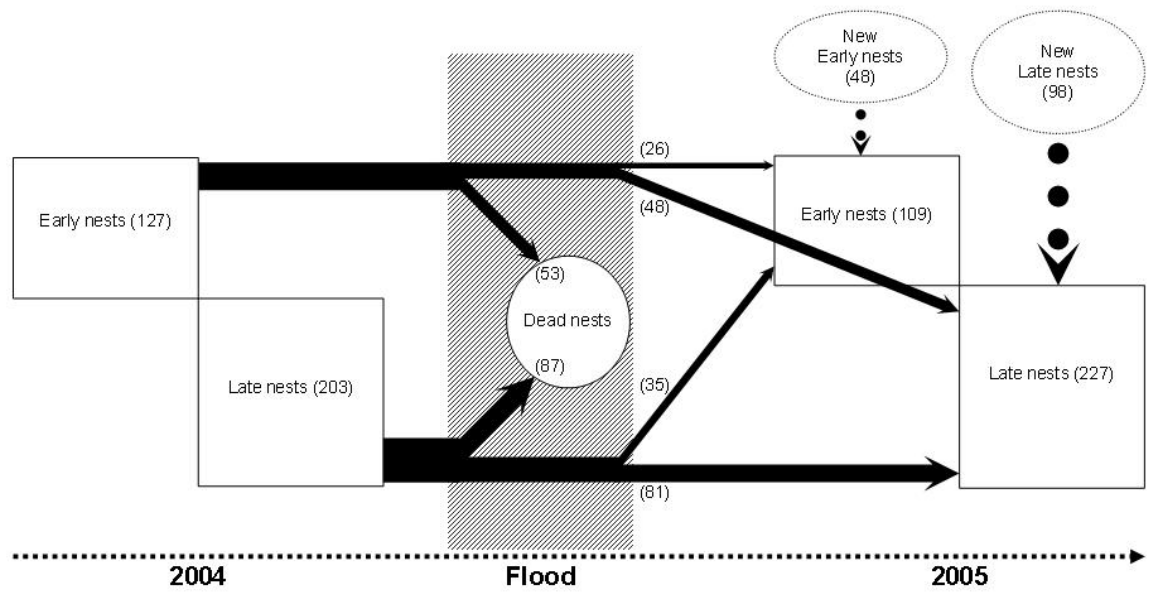
Figure 9: A. Interaction between the distribution of the existing (emerged or still cryptic) nests (little dashed lines) and the new founding ones (full line). B. Interaction between the distribution of the early new founded nests plus the surviving nests (little dashed lines) and the late new founding ones (full line).



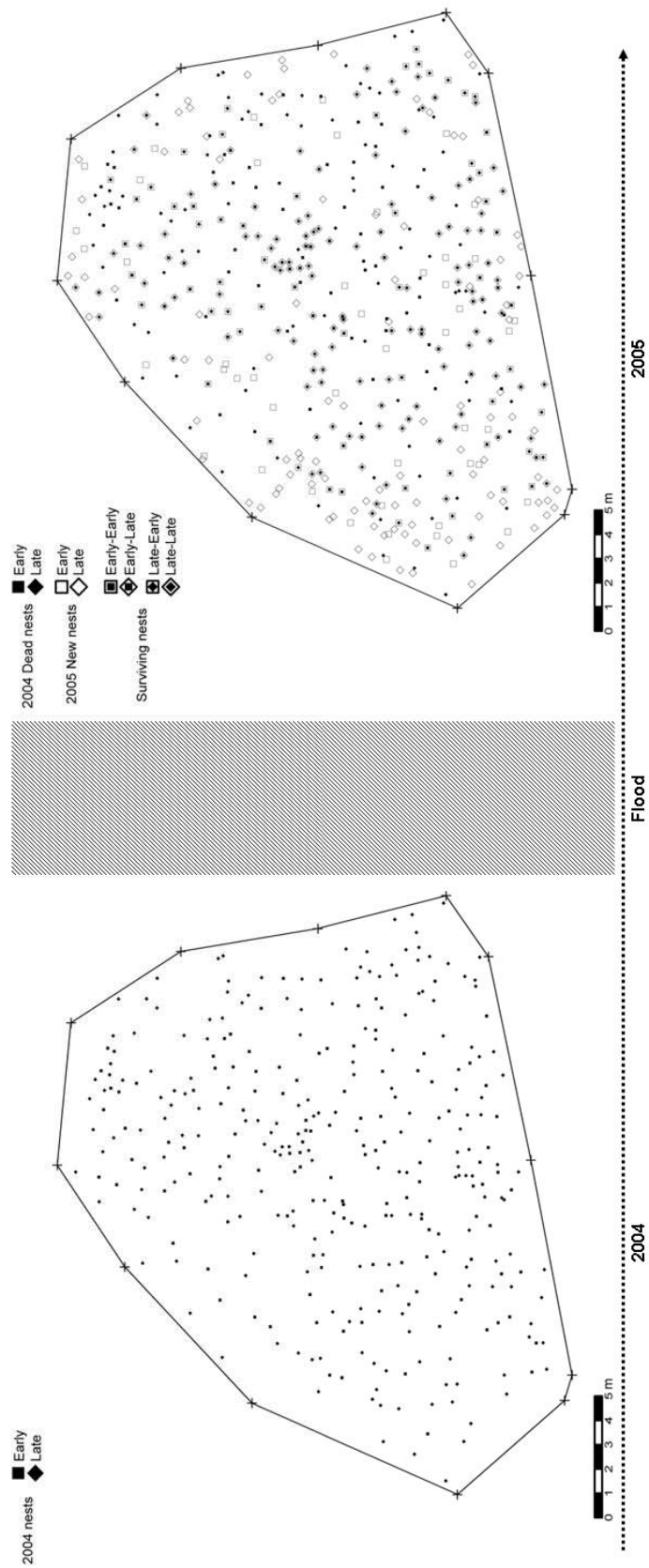
Lenoir et al. Figure 1



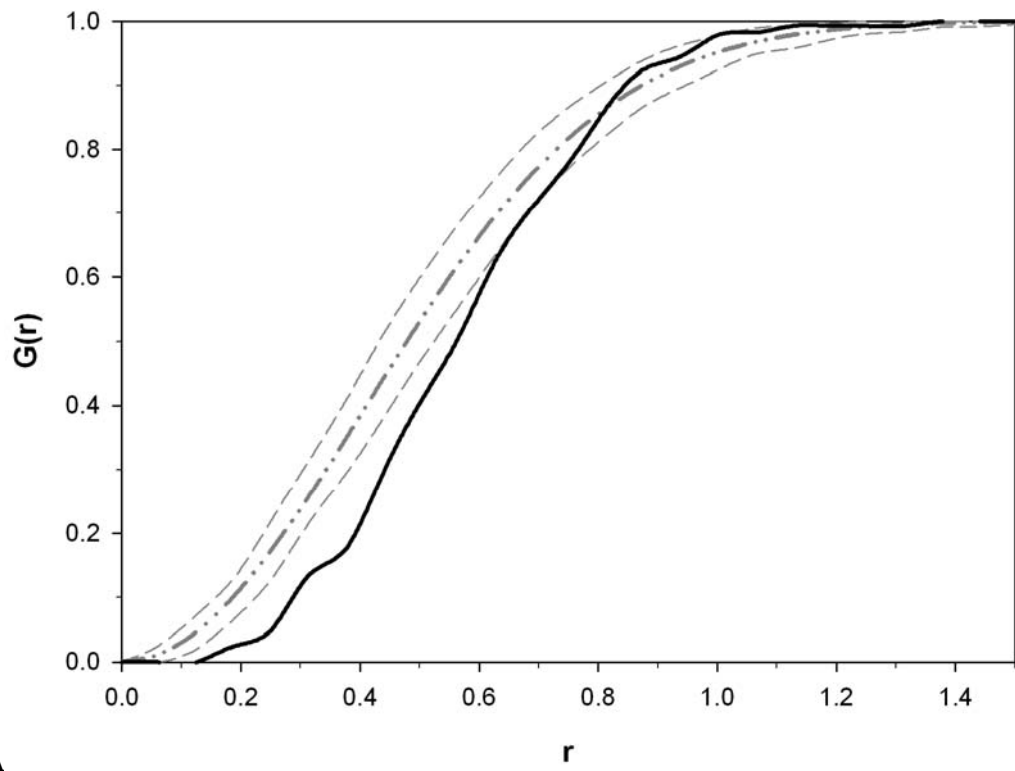
Lenoir et al. Figure 2



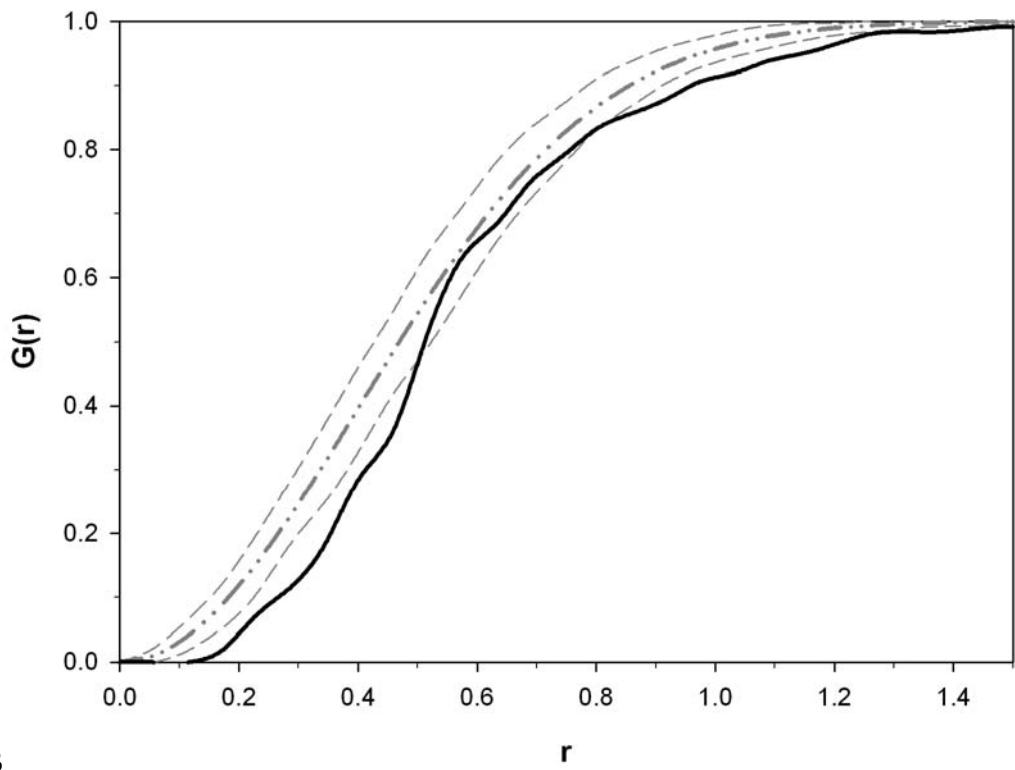
Lenoir et al. Figure 3



Lenoir et al. Figure 4

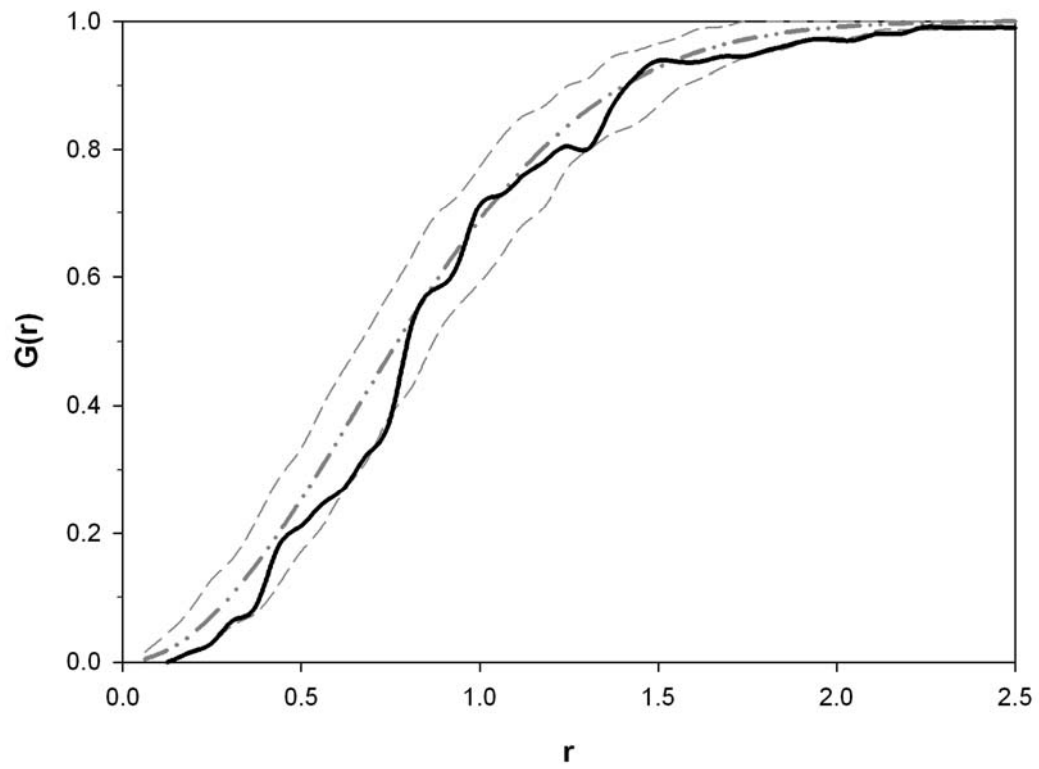


A

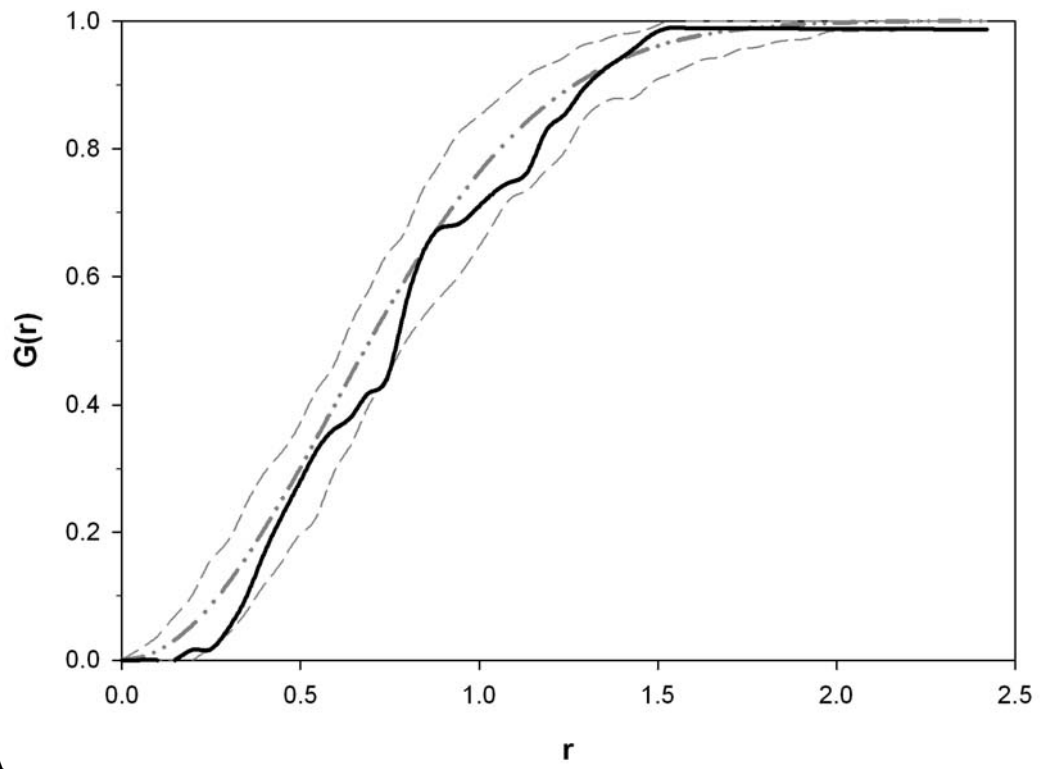


B

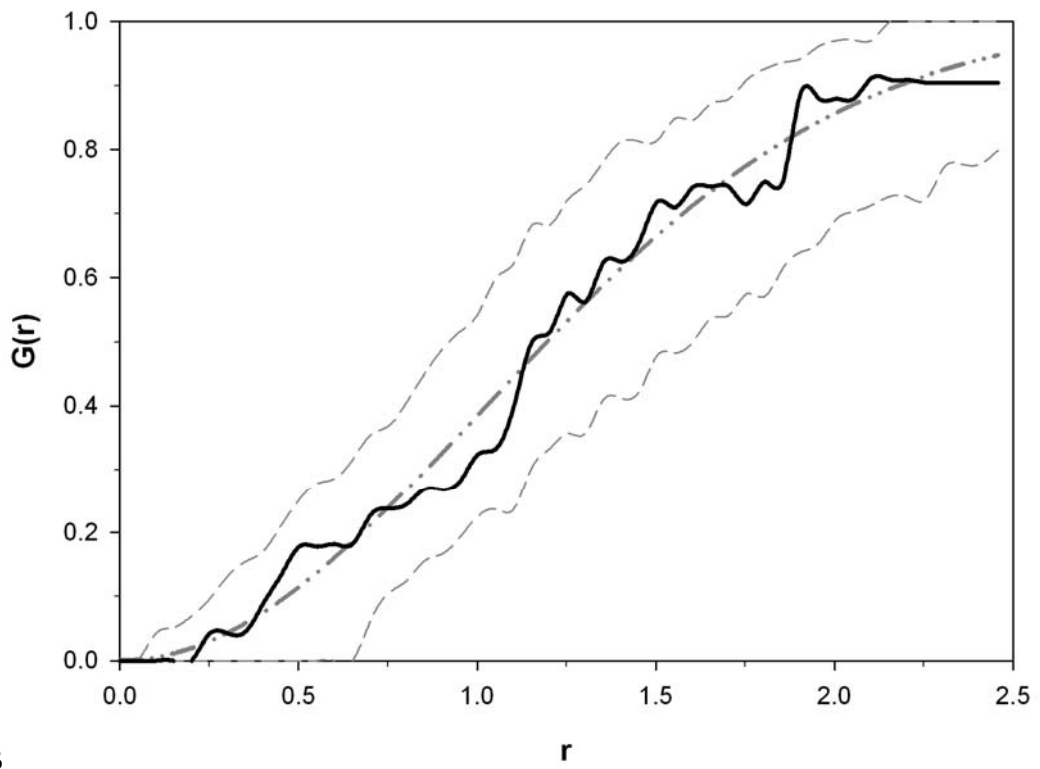
Lenoir et al. Figure 5



Lenoir et al. Figure 6

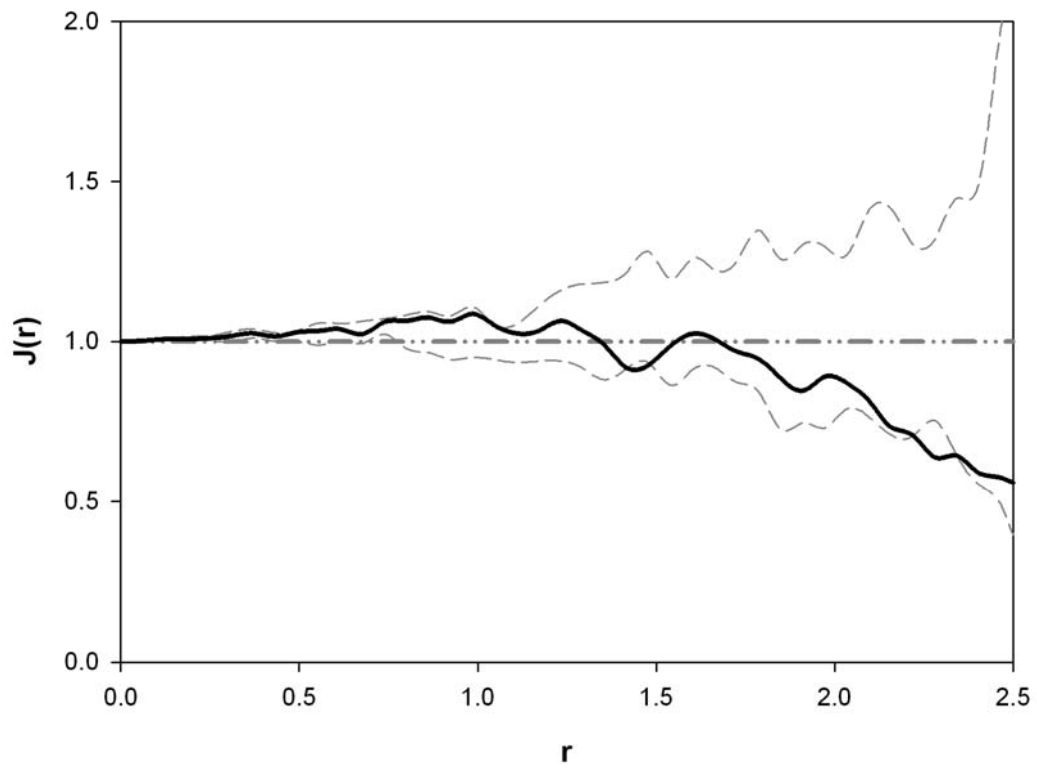


A

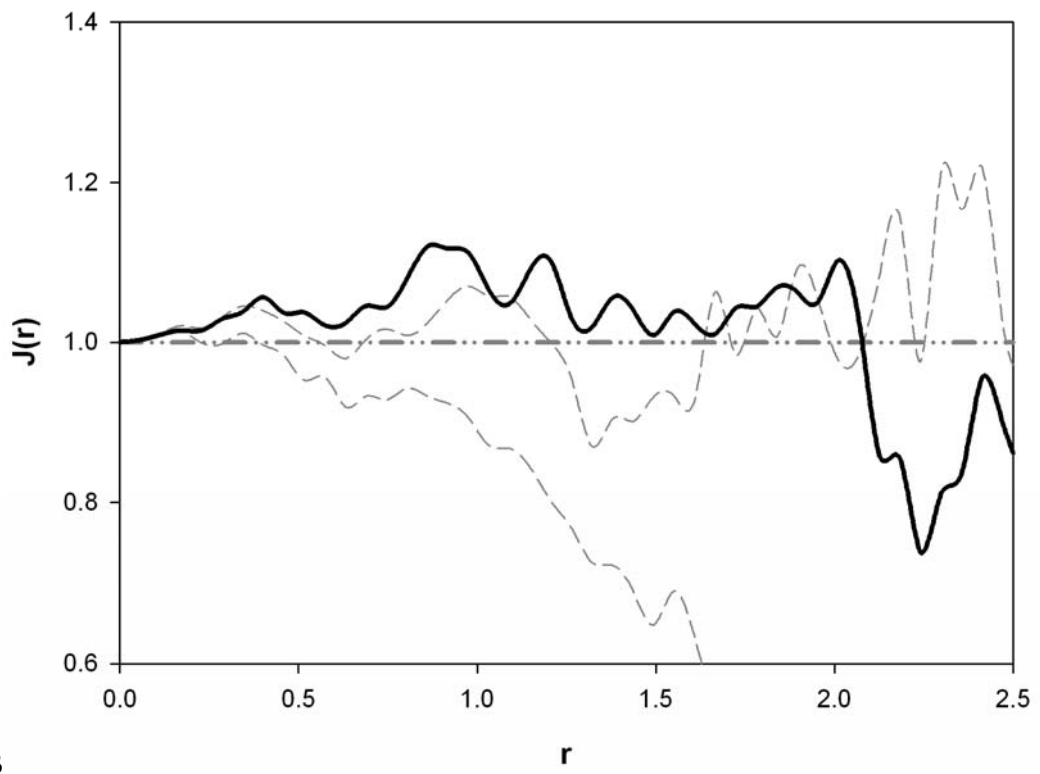
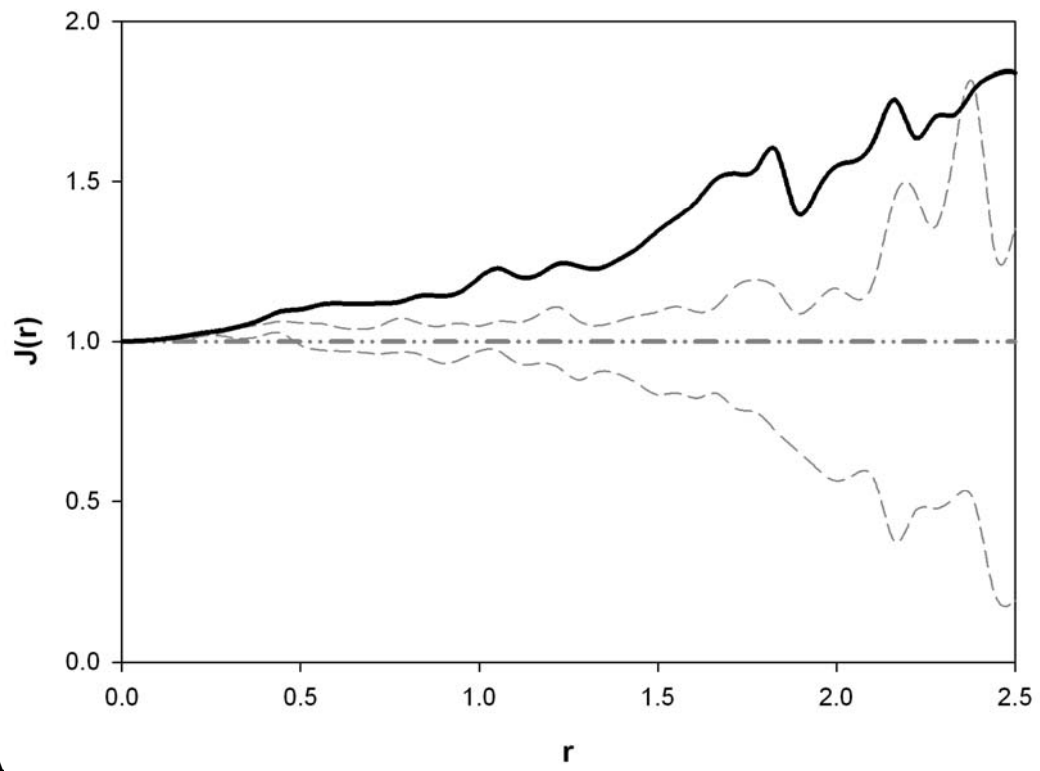


B

Lenoir et al. Figure 7



Lenoir et al. Figure 8



Lenoir et al. Figure 9

Structure génétique des nids et des populations

Article 3. Développement de marqueurs microsatellites pour l'étude de la fourmi *Cardiocondyla elegans*

Résumé

Cet article représente un travail méthodologique de mise au point de marqueurs microsatellites nécessaire à l'analyse de la structure génétique des colonies et des populations de *C. elegans*. En effet, plusieurs marqueurs couramment utilisés pour d'autres espèces de *Cardiocondyla* (Schrempf *et al.* 2005) se sont révélés inutilisables pour *C. elegans*. Bien que ces microsatellites soient présents dans le génome de *C. elegans*, ils ne présentent aucune variabilité. Il nous a donc fallu trouver de nouveaux microsatellites variables (plus de 2 allèles) pour cette espèce. Nous avons demandé au Savannah River Ecology Laboratory de le réaliser ce long travail pour nous. Une fois les microsatellites identifiés, nous avons testé leur variabilité à l'IRBI et, finalement, 5 nouveaux marqueurs microsatellites spécifiques de *C. elegans* ont montré une variabilité suffisante pour envisager une étude sur la structure génétique des colonies et des populations, étude que nous avons réalisée dans le laboratoire de Biologie I de l'Université de Regensburg.



Jean-Christophe Lenoir, Alexandra Schrempf, Alain Lenoir, Jürgen Heinze et Jean-Luc Mercier (2005) Five polymorphic microsatellite markers for the study of *Cardiocondyla elegans* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Molecular Ecology Notes*, 5, 565–566

PRIMER NOTE

Five polymorphic microsatellite markers for the study of *Cardiocondyla elegans* (Hymenoptera: Myrmicinae)

JEAN-CHRISTOPHE LENOIR,* ALEXANDRA SCHREMPF,† ALAIN LENOIR,* JÜRGEN HEINZE† and JEAN-LUC MERCIER*

*Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, Université François Rabelais, 37200 Tours, France, †Biologie I, Universität Regensburg, D-93040 Regensburg, Germany

Abstract

We describe primer sequences for five microsatellite markers in *Cardiocondyla elegans*, an ant species with ergatoid males. Polymorphism of these loci was investigated using 236 individuals from 22 colonies from four locations. The microsatellites are dinucleotide repeats with four to 16 alleles, and the observed heterozygosity ranges from 0.244 to 0.720. We characterized these markers for the study of the population as well as the social structure of colonies.

Keywords: *Cardiocondyla elegans*, dinucleotide repeats, ergatoid ant males, microsatellites

Received 2 February 2005; revision accepted 1 March 2005

Cardiocondyla elegans Emery, 1869, is a small myrmicine ant (c. 2.3 mm long) that lives in sandy and moist soil. Bernard (1968) reported that *C. elegans* is a Mediterranean ant that builds nests on river banks. He accurately described workers and winged females, but mistook the males for queens of a new socially parasitic ant, *Xenometra gallica*. This error occurred because the orange to yellow males of *C. elegans* are ergatoid (wingless), unlike males of other ant species, and differ greatly in colour from the completely black workers and the winged queens. Baroni Urbani (1973), corrected this mistake by redescribing '*X. gallica*' queens as *C. elegans* males. Because the males are ergatoid, there are no nuptial flights and copulations occur inside the nests. Another peculiarity of *C. elegans* is that many (c. 10) ergatoid males can live peacefully in the same nest as opposed to other species of the same genus, e.g. *Cardiocondyla minutior* or *Cardiocondyla mauritanica* (Heinze 1997).

To gain a better understanding of the genetic structure of populations and colonies of this species, we developed specific microsatellite markers. DNA was extracted from pooled 140 *C. elegans* workers from two colonies, one from Montlouis-sur-Loire (Indre et Loire, France) and one from Carennac (Lot, France), using the DNEasy® Tissue

Kit (QIAGEN). Extracted DNA was sent to the Savannah River Ecology Laboratory, Aiken, SC, USA for microsatellite isolation. Details of the protocol are available from Travis C. Glenn (glenn@srel.edu). Briefly, as outlined by Hauswaldt & Glenn (2003), the DNA was digested with *RsaI*, ligated to SuperSNX linkers, hybridized to biotinylated microsatellite oligonucleotides and captured on Dynabeads (DynaL Biotech). Captured DNA was recovered by polymerase chain reactions (PCR) with SuperSNX-f (5'-GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC-3') and cloned using the TOPO TA Cloning System 2.1 (Invitrogen). White colonies were amplified using M13 forward and reverse primers. PCR products of 500–1000 bp were sequenced using BigDye version 2.0 (Applied Biosystems). Sequences were assembled and edited in SEQUENCHER version 4.1.2 (Gene Codes Corporation) and exported to EPHEMERIS version 1.0 to automatically search sequences for microsatellite repeats. Twenty primer pairs were designed, but only five of them showed variability. This was investigated by genotyping 10 individuals from nine *C. elegans* colonies from three different locations for each of the primer pairs according to the protocol described in Dronnet *et al.* (2004). All of the five variable markers are 'AG' or 'AC' dinucleotide repeats (Table 1).

For a more detailed study of these five variable microsatellites, DNA of 236 workers from 22 colonies from four different locations (Montlouis-sur-Loire and Candes

Correspondence: J.-C. Lenoir, Fax: (+33) 2 47 36 72 85; E-mail: jean-christophe.lenoir@etu.univ-tours.fr

566 PRIMER NOTE

Table 1 Characterization of primer sequence of five variable microsatellite loci in *Cardiocondyla elegans*

Locus	Primer sequence (5'–3')	Repeat sequence	Size range (bp)	T_a (°C)	Label of F-primer	N	No. of alleles	H_O	H_E	GenBank Accession no.
CE2–3A	F: CCGTCTTTTCCACTCAC R: GGAATCGTCGAGAGAGA	(AG) ₁₉	103–129	60	TET	214	13	0.558	0.753	AY911417
CE2–4A	F: TGGGAGTGGATGTATGA R: CCCACCTTACAGCAATATC	(AG) ₂₀	178–192	60	FAM	155	7	0.690	0.807	AY911418
CE2–5D	F: AGACGTAAGGTTTGAAGAGA R: ACAACTATGCCAAATTAAGTAT	(AC) ₁₅	204–210	60	HEX	215	4	0.244	0.580	AY911419
CE2–12D	F: TCCGCTAAATTTATCATGG R: TCGAGTGCATAAAGGAATA	(AG) ₁₀	124–148	60	FAM	182	9	0.379	0.770	AY911420
CE2–4E	F: ATACAAAAGAATATGAAGTAATACA R: GTGTGCTTATGTATCTGGTAT	(AC) ₂₅	139–175	60	HEX	148	16	0.720	0.847	AY911421

T_a , annealing temperature; N, number of individuals; no. of alleles, observed number of alleles; H_O , observed heterozygosity; and H_E , expected heterozygosity.

Saint Martin, Indre et Loire; Carennac, Lot; Chemilly, Allier), was extracted using a Puregene® DNA isolation kit (Gentra Systems), according to Foitzik & Herbers (2001). Standard PCRs (Biometa T1 thermocycler, Whatman) were carried out in a final 20-µL reaction volume containing 1 to 50 ng DNA, 1× buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM per dNTP (MBI Fermentas), 0.6 µM unlabelled reverse primer, 0.6 µM labelled (TET, FAM and HEX dyes) forward primer, 0.5 U Taq DNA polymerase (Qbiogene). Because locus CE2–4E is very sensitive to contamination, we used only half of the volume of DNA solution. PCR was performed using the following program: initial denaturation step at 94 °C (3 min), followed by 40 cycles at 94 °C (45 s), 60 °C (45 s) and 72 °C (45 s), with a final extension step at 72 °C (7 min). PCR products were visualized on an ABI PRISM 310 genetic analyser (PE Biosystems) and allele size was analysed by using a GeneScan-500 size standard (TAMRA) and GENESCAN 3.1 software (PE Biosystems).

The five polymorphic loci showed four to 16 alleles per locus and the observed heterozygosity ranged from 0.244 to 0.720. For each locus, observed heterozygosity was always significantly smaller than the expected heterozygosity ($P < 0.001$, GENEPOP web version 3.4 option: Hardy–Weinberg test). Linkage disequilibrium test from GENEPOP web version 3.4 indicates a nonrandom relation of these loci from each other ($P < 0.001$ for each pair of loci). This low heterozygosity and linkage between loci may in part result from allele frequencies differing between collecting sites, but is also consistent with the fact that ergatoid males are able to breed with their sisters inside the nest (Schrempf *et al.* 2005). These first variable microsatellites in *C. elegans* will be useful in studying social

structure of the colonies as well as relationships between nests or populations.

Acknowledgements

We thank Travis C. Glenn, Mandy N. Schable and the Savannah River Ecology Laboratory of the University of Georgia for microsatellite isolation and primer design. We also want to thank Simon Dupont from Tours (IRBI), Tina Wanke and Andreas Trindl from Regensburg for technical support. We thank Hannah Reynolds for correcting the English of this paper. Our research was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (He 1623/12) and the project based personnel exchange programme PROCOPE by DAAD and EGIDE.

References

- Baroni Urbani C (1973) Die gattung *Xenometra*, ein objektives synonym (Hymenoptera, Formicidae). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, **46**, 199–201.
- Bernard F (1968) *Faune de l'Europe et Du Bassin Méditerranéen*. Masson et Cie, Paris.
- Dronnet S, Bagnères A-G, Juba TR, Vargo EL (2004) Polymorphic microsatellite loci in the European subterranean termite, *Reticulitermesantonensis* Feytaud. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 127–129.
- Foitzik S, Herbers J (2001) Colony structure of a slavemaking ant. 1. Intracolony relatedness, worker reproduction, and polydomy. *Evolution*, **55**, 307–315.
- Hauswaldt JS, Glenn TC (2003) Microsatellite DNA loci from the Diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Molecular Ecology Notes*, **3**, 174–176.
- Heinze J (1997) Male reproductive strategies in ants. *Proceedings of the International Colloquia on Social Insects*, Russian Language Section of the IUSSI, Socium, St Petersburg, **3–4**, 179–187.
- Schrempf A, Reber C, Tinaut A, Heinze J (2005) Inbreeding and local mate competition in the ant *Cardiocondyla batesii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **57**, 502–510.

Article 4. Structure génétique et stratégie de reproduction de *Cardiocondyla elegans* : quand des nids monogynes sont envahis par des sexués étrangers

Résumé :

En utilisant les marqueurs microsatellites développés pour *Cardiocondyla elegans*, nous avons entrepris l'étude de la structure génétique des populations. Nous avons utilisé 21 colonies provenant de 3 localités : Montlouis-sur-Loire (Indre et Loire), Carennac et Pinsac (Lot), et Chemilly (Allier). Dix ouvrières ont été génotypées pour chacune de ces colonies. De plus, pour une colonie de Montlouis-sur-Loire et une colonie de Chemilly, 10 femelles ailées, le sperme contenu dans leur spermathèque, et tous les mâles trouvés dans la fourmilière lors de leur récupération sur le terrain (8 et 3 mâles respectivement) ont été génotypés.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence ce que nous avons observé lors de la récolte des nids. *C. elegans* est une espèce monogyne. Tous les individus génotypés par colonie, à quelques très rares exceptions près, sont issus d'une seule reine. Cette reine est à chaque fois fécondée par plusieurs mâles. En effet, 2 à 9 fratries ont été retrouvées par colonies. L'« effective paternity », qui correspond à la participation relative de chaque mâle dans la descendance de la reine, correspond au nombre moyen de mâles qui fécondent les reines ($m_{e(p)} \text{ pop} = 4,37 \pm 1,65$; nombre moyen de fratries = $4,52 \pm 1,6$; NS). Dans cette espèce de fourmi, les mâles ergatoïdes sont censés s'accoupler avec leurs sœurs à l'intérieur de leur nid d'origine. Nous attendions donc un taux de consanguinité très élevé. Or nos résultats indiquent que la consanguinité globale est de $0,49 \pm 0,06$, ce qui est plus faible qu'attendu. Nos résultats indiquent également que 30% des accouplements font intervenir des individus qui ne sont pas génétiquement liés. Ceci est surprenant lorsque l'on considère le système reproductif décrit pour cette espèce.

Des tests sur l'adoption d'individus sexués en laboratoire, des observations de terrain ainsi que les résultats génétiques obtenus sur les sexués, ont confirmé la présence de sexués (mâles et femelles ailées) dans des colonies qui leurs sont génétiquement étrangères. Les femelles peuvent ainsi copuler à l'intérieur de leur nid maternel avec leurs frères, mais également avec des mâles venant d'autres colonies. En effet, les mâles ne sont jamais agressés par les ouvrières et peuvent ainsi changer facilement de nid. En revanche, les femelles ailées subissent en général de nombreuses agressions de la part des ouvrières si elles tentent d'entrer par elles-mêmes dans une colonie étrangère. Un mécanisme, décrit ici pour la première fois, va se mettre alors en place : certaines femelles ailées sont activement transportées d'une colonie

vers une autre par une ouvrière. Ce simple transport semble être suffisant pour éviter le contact et l'agressivité générale des ouvrières recevant la nouvelle femelle. Ainsi, les femelles ailées vont pouvoir copuler avec les mâles issus de cette colonie étrangère ou venant d'ailleurs.



Jean-Christophe Lenoir, Alexandra Schrempf, Alain Lenoir, Jürgen Heinze et Jean-Luc Mercier. Genetic structure and reproductive strategy of the ant *Cardiocondyla elegans*: strictly monogynous nests invaded by unrelated sexuals. (Accepté par *Molecular Ecology*).

Genetic structure and reproductive strategy of the ant *Cardiocondyla elegans*: strictly monogynous nests invaded by unrelated sexuals.

J.-C. Lenoir^{*}, A. Schrempf[§], A. Lenoir^{*}, J. Heinze[§] and J.-L. Mercier^{*}

^{*}*Université François Rabelais, Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, 37200 Tours, France.*

[§]*Biologie I, Universität Regensburg, D-93040, Regensburg, Germany.*

Keywords: *Cardiocondyla*, multiple mating, colony genetic structure, ergatoid males, inbreeding, intranidal mating.

Corresponding author: Jean-Christophe Lenoir.

Université François Rabelais, Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, 37200 Tours, France.

Tel: (33) 2 47 36 71 23

Fax: (33) 2 47 36 72 85

E-mail: jean-christophe.lenoir@etu.univ-tours.fr

Running title: How does a nest become an open mating place?

Abstract

Cardiocondyla elegans is a Mediterranean ant that nests on river banks. It rears only wingless (ergatoid) males that live peacefully in the same nest as opposed to other species of the same genus, which have both peaceful winged and mutually aggressive, “ergatoid” males. Using microsatellite analysis we investigated the genetic structure of 21 colonies from three different locations as well as the parentage of sexuals of two colonies of *C. elegans*. We show that *C. elegans* is strictly monogynous and that its nests can contain foreign sexuals. The presence of alien sexuals inside ant nests is described for the first time and probably counteracts inbreeding resulting from matings between siblings. In the laboratory, aggression tests showed that workers only allow alien males to enter their nests, while all winged female sexuals attempting to enter were attacked. Nevertheless, the presence of alien female sexuals in nests in the field seems to result from active carrying behaviour by workers during the reproductive period.

Introduction

Sexual selection is one of the most powerful forces in evolution and has led to an extreme diversity in mating strategies. Males compete with other males over access to females and therefore typically have evolved effective weapons, costly ornaments, or elaborate courtship displays (Andersson 1994). Social insects are a striking exception to this rule, because here mating is usually an inconspicuous event restricted to a brief period of frantic activity. Thus, male adaptations to harm or kill rival males appear to be extremely rare and occur only where males can obtain and defend a harem of queens, i.e., when mating occurs in the nest (Boomsma *et al.* 2005). In insects in general, local mating in such limited and confined areas has repeatedly led to the evolution of male polymorphisms with winged disperser males and territorial, wingless or wing-reduced fighter males (Cook *et al.* 1997), and several cases are also known from Hymenoptera (e.g., Kukuk & Schwarz 1988; Danforth 1991; Danforth & Neff 1992; Danforth & Desjardins 1999). In ants, wingless fighter males (ergatoid males) are known only from two genera, *Hypoponera* (Hamilton 1979; Yamauchi *et al.* 1996) and *Cardiocondyla* (Kinomura & Yamauchi 1987; Stuart *et al.* 1987; Heinze & Hölldobler 1993; Cremer *et al.* 2002a; Cremer & Heinze 2003).

The genus *Cardiocondyla* is of particular interest, as male tactics and colony structure vary considerably between species. Ergatoid, wingless males as well as “normal”, winged males mate within the colony with young, virgin queens. *C. obscurior*, *C. minutior*, *C. mauritanica*, and *C. emeryi* are polygynous (several queens per colony) and ergatoid males engage in lethal fighting for access to virgin queens (Kinomura & Yamauchi 1987; Stuart *et al.* 1987; Heinze & Hölldobler 1993; Heinze *et al.* 1998). The winged males of these species are usually tolerated by the ergatoid males, probably because they chemically resemble virgin queens (Cremer *et al.* 2002b). After a short period of mating in the nest, winged males emigrate to mate with virgin queens from other colonies. *C. mauritanica* and *C. kagutsuchi* from Okinawa are polygynous, but in contrast to the other polygynous species have lost winged males (Heinze & Hölldobler 1993; Heinze *et al.* 2005). Finally, *C. elegans*, *C. batesii*, *C. ulianini* and several other Eurasian species are monogynous (a single queen per nest) and also lack winged males. In contrast to the polygynous species, ergatoid males of monogynous species appear to be mutually tolerant (Boomsma *et al.* 2005; Schrempf *et al.* 2005).

While several previous studies have focused on polygynous *Cardiocondyla*, comparatively little is known on monogynous species. Here we study *Cardiocondyla elegans* Emery, 1869, a species lacking both winged males and seemingly also pre-mating dispersal of the female sex (ergatoid males are supposed to stay in their maternal nest during all their life and

consequently mate with sisters, like in other *Cardiocondyla* species), which is supposed to lead to inbreeding. As in other *Cardiocondyla* (Heinze & Hölldobler 1993), ergatoid males have a continuous spermatogenesis and are able to mate with numerous winged female sexuals in the nest during the whole mating period in late summer and fall. Thereafter, males die and the inseminated, but still winged, female sexuals remain inside the nests for hibernation. They leave their nests and disperse on the wing or on foot in spring. We investigated how this peculiar life history affects the colony and population structure and how inbreeding depression is avoided.

Materials and Methods

Study site and species

C. elegans colonies are monogynous (only one wingless queen was found in each excavated nest) and have only mutually tolerant ergatoid males. One nest can contain several hundred workers (mean $\pm$ SD = 204.43 ± 182.09 ; range: [15-802], N = 42), about 5 males (5.27 ± 4.31 ; range: [1-17], N = 37) and dozens of winged females (76.64 ± 78.15 ; range: [2-367], N = 42) (J-C Lenoir & J-L Mercier unpublished data).

We investigated 226 workers from 21 colonies collected during the summer (June till August) 2004 at three different sites separated by at least 200 km: Montlouis sur Loire (Indre et Loire, France, colonies “M”), Carennac and Pinsac (Lot, France, colonies “C” and “P”), and Chemilly (Allier, France, colonies “A”). All studied populations were located on the sand banks of the rivers Loire, Dordogne, and Allier, respectively.

For one colony each from Montlouis sur Loire and Chemilly, we also genotyped all males found in the nest (N = 8 and 3), 10 winged females, and the sperm of their spermatheca.

Microsatellite analysis of individuals and sperm

Five specific polymorphic microsatellites of *C. elegans* (CE2-3A, CE2-4A, CE2-5D, CE2-12D and CE2-4E) (Lenoir *et al.* 2005) were used to determine the genetic structure of workers, males, winged females and the sperm. DNA was extracted from individual ants using a Puregene® DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN), according to Foitzik and Herbers (2001). For the analysis of sperm, winged females were kept in 96% ethanol for approximately 10 days to dehydrate the tissue. Thereafter, they were dissected in distilled water, the spermatheca was isolated and its membrane was crushed to release the dried pellet of sperm. Thus, only male material was used for sperm analysis. Sperm DNA was extracted using the protocol by Chapuisat (1998): sperm was incubated for 2 hours at 37°C in

a final concentration of 0.05 mg/ml proteinase K, 1.75 μ M SDS and 20 mM DTT. Proteinase K was then inactivated by heating the lysate at 95°C for 10 min and this solution was used in Polymerase Chain Reactions (PCR).

PCR (Biometra T1 thermocycler, Whatman) was carried out in a final 20 μ l reaction volume containing 1 to 50 ng DNA, 10x polymerase buffer (50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl), 2 mM MgCl₂, 200 μ M per dNTP (MBI Fermentas), 0.6 μ M unlabelled reverse primer, 0.6 μ M labelled (Tet, Fam and Hex dyes) forward primer, 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Q BIOgene). PCR was performed using the following program: initial denaturation step at 94°C (3 min), followed by 40 cycles at 94°C (45 sec), 60°C (45 sec) and 72°C (45 sec), with a final extension step at 72°C (7 min). PCR-Products were visualized on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems) and allele size was analyzed by using Genescan 500 size standard (Tamra) and GeneScan 3.1 software (PE Biosystems) (Lenoir *et al.* 2005).

Colony structure and population genetic analysis

We used MATESOFT Software (Moilanen *et al.* 2004) (<http://www.zi.ku.dk/personal/jspedersen/matesoft.htm>) to determine the genotypes of the queen and her mate(s) from worker genotypes. We also calculated the effective paternity for each colony ($m_{e(s)}$) and the population effective mating frequency ($m_{e(s) pop}$) following Starr (1984):

$$m_{e(s)} = \frac{1}{\sum_i p_i^2} \text{ and } m_{e(s) pop} = \frac{n_{colo}}{\sum_j \sum_i p_{ij}^2},$$

where p_i is the proportional contribution of the i th male that mated with the queen of the colony and p_{ij} the proportional contribution of the i th male in the j th of n_{colo} colonies.

These values were compared with unbiased sample statistic of m_e corrected for non-sampling error as suggested by Pamilo (1993):

$$m_{e(p)} = \frac{n_{ind} - 1}{n_{ind} \sum_i p_i^2 - 1},$$

where n_{ind} is the number of workers genotyped in the respective colony. Moreover, we adapted this correction to the population effective mating frequency $m_{e(p) pop}$, using the mean number of genotyped workers per colony:

$$m_{e(p) pop} = \frac{n_{colo}(n_{ind} - 1)}{\sum_j n_{ind} \sum_i p_{ij}^2 - 1}.$$

We estimated 95% confidence intervals of $m_{e(p)}$ and $m_{e(p) pop}$, using equation 9 of Tarpy and Nielsen (2002):

$$\ln[95\% C.I. of m_{e(p)}] = 0.643 - 1.101 \bullet \ln(n_{ind}) + 1.637 \bullet \ln(N),$$

where N is the most probable number of patriline obtained by MATESOFT.

When two males have identical genotypes, possible double matings cannot be detected, resulting in a non-detection error. The probability that two random males share the same genotype is given by $\prod_l \sum_i p_i^2$, where p_i is the population frequency of the i th allele at the l th locus (e.g. Boomsma & Ratnieks 1996). This probability becomes insignificant when several moderately polymorphic microsatellite markers are used (Chapuisat 1998).

Nevertheless, as inbreeding can cause a non-detection error because of identical male genotypes at all loci, m_e can be corrected for non-sampling error and non-detection error following Schrempf *et al.* (2005):

$$m_{e,p} = \frac{1}{\frac{n_{ind} \sum_i p_i^2 - 1}{n_{ind} - 1} (1 - \prod_l (F_{IS} + (1 - F_{IS})(1 - H_{exp,l})))},$$

where F_{IS} is the inbreeding coefficient and $H_{exp,l}$ is the expected heterozygosity at the l th locus in the absence of inbreeding (e.g. Lenoir *et al.* 2005 for *C. elegans*).

Due to limited samples for sperm-typing, queen mating frequencies were inferred from workers genotypes. Sperm-typing was used to determine whether female sexuals and their mates were brothers and sisters, i.e., shared alleles derived from the colony's queen, or were unrelated.

Allele frequencies and relatedness R among nestmates were calculated using the software RELATEDNESS v.5.00 by the method of Queller and Goodnight (1989). Colonies were weighted equally and the standard errors were obtained by jackknifing over colonies. Alien and native individuals were determined by comparing their genotypes to the inferred genotype of the colony queen. According to the haplodiploid reproductive system of ants, males with at least one allele at one locus that did not match the colony queen's inferred genotype were considered as alien males. Females with at least two alleles at one locus differing from the

colony queen's inferred genotype were considered as alien females. As males are haploid, the number of alleles found by sperm amplification corresponds to the minimum number of the queen's mates. GDA 1.0 software (Lewis & Zaykin 2001) was applied to estimate F -statistics with a three-level analysis according to the method of Weir and Cockerham (1984). The three levels are represented by individuals within the colony, colonies within subpopulations (corresponding to the three investigated sites) and subpopulations within the population. A comparison of pairs of genes within an individual with random genes within the subpopulation gives information on the amount of inbreeding due to non-random mating (in the following stated F_{IS}), and differences of allele frequencies between subpopulations compared to random genes within the population give information on gene flow between the subpopulations (in the following stated F_{ST}).

Behavioural observations

To determine whether colonies adopt alien sexuals, we introduced sexuals (8 males and 45 winged females) from three colonies from Montlouis sur Loire one by one into the foraging arena of 15 different colonies, which came from the same subpopulation (8 colonies) or from Carennac (7 colonies). The "adopting" colonies had been kept in the laboratory for several days to one year and contained a minimum of 100 workers, about 30 winged females, 30 larvae, 1 queen, and no males. Each sexual was introduced into the foraging arena of the "adopting" laboratory colony and the behaviour of workers in contact with the foreign sexual was recorded for the first 5 minutes. Within this time, males usually have entered the nests and attempted copulations with female sexuals and winged female sexuals have been bitten and stung by several workers. As several workers can interact simultaneously with the sexual, we always noted the most aggressive behaviour towards the sexual. An aggression index was calculated following Errard & Hefetz (1997) and Errard *et al.* (2003): 0 = antennal contact, 1 = mandibles opening, 2 = biting and 3 = gaster flexion (stinging assay). The frequency and duration of each behaviour were registered using ETHOLOG 2.25 (Ottoni 2000) (<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/2727/ethohome.html>). The overall aggression exhibited in each test was calculated as in Errard & Hefetz (1997) and Errard *et al.* (2003):

$$\frac{\sum_{i=1}^n AI_i \bullet t_i}{T},$$

where AI_i and t_i are the aggression index and the duration of each act respectively and T is the total interaction time defined as the total time during which the ants were in physical contact.

The final success or failure of the adoption was also checked 3 hours, 24 hours and 72 hours after the introduction of the sexuals.

Field observations were conducted during the reproductive period of *C. elegans* (from the end of July to the end of September) of 2003 and 2004 in Montlouis sur Loire in a 318 m² area containing 330 nests, and more anecdotally in Carennac.

Results

Colony and population structure

The three populations differed in allele frequencies. For example, alleles “123” and “125” of locus CE2-3A were found only in Indre et Loire, alleles “115” and “129” only at Dordogne and alleles “105” and “113” only at Allier (Appendix). Consequently, the value of F_{ST} (allele frequency differences between subpopulations), is positive (0.265; 95% C.I. [0.1607 - 0.4226]), indicating limited gene flow between populations (Table 1).

In all investigated colonies, the genotype of the workers could be explained by a single mother queen. Only in a few colonies (C02, P03, A01, A02, A07), one or two genotyped workers appeared to be totally unrelated with the other workers of the colony and were removed from the analysis (sample sizes of less than 10 indicate that foreign workers were excluded). These workers most likely represent individual foragers that accidentally entered the wrong nest. The mean relatedness between workers of the colonies, not corrected for inbreeding effects, was 0.43 ± 0.06 , 0.58 ± 0.09 , and 0.36 ± 0.1 , respectively, for Montlouis sur Loire (M), Carennac plus Pinsac (C and P), and Chemilly (A). Over all subpopulations and over all loci, relatedness R is 0.49 ± 0.06 (Table 2). The fact that workers of colonies are related is also expressed by negative values of f obtained by GDA, which are based on a comparison of individual genotypes with random genes within the colonies (Table 1).

The inbreeding coefficient is positive over all loci and its confidence interval does not overlap zero, indicating significant inbreeding (Table 1). The estimation of sib-mating frequency α from Pamilo (1985) or Suzuki & Iwasa (1980): $F_{IS} = \alpha/(4-3\alpha)$ indicates that winged females mate in 70.43% of their copulations with a brother.

Mother queens were always multiply mated, with at least 2 to 9 different mates (mean number of patrilines $\pm$ SD = 4.52 ± 1.6 ; Table 2). The chance that the genotypes of two random males that mate with the same female are identical (non-detection error) is 0.0004, thus, the probability to miss double mating is negligible. The mean population effective mating

frequency (after Pamilo 1993) corrected for non-sampling error is 4.37 ± 1.65 . Calculations, which do not take the non-sampling error into account, result in a lower number of patriline (3.25), which is probably an underestimation. Contrary, corrections for inbreeding result in a high estimation of m_e (8.78 ± 10.71), which seems to be an overestimation, mainly due to a few colonies, in which a very high number of patriline was found in a limited number of workers (see Table 2 for all results).

The correlation between the minimum number of patriline (N) and effective paternity ($m_{e(p)}$) is positive and significant (Spearman rank correlation, $N = 21$, $r_s = 0.9194$, $p = 0.001$). The mean number of males found in the colonies is not significantly different from the mean number of males that mate with a female (Mann-Whitney U-test, $N = 58$, $U = 354$, $p = 0.5733$).

The comparative analysis of the genotypes of 11 males, 20 winged female sexuals and the sperm in their spermathecae indicates that colonies contain both, alien and native sexuals. Consequently, we found that female sexuals are inseminated by their brothers as well as by alien males (Table 3). The proportion of native and alien sexuals individuals in Table 3A are for the two studied colonies and are not representative for the whole population. Table 3B provides data on native and alien sexuals as well as the genotype of sperm found in the spermatheca of young queens.

Aggression index and adoptions

Workers were significantly more aggressive towards introduced female sexuals than towards males (Mann-Whitney U test, $N = 53$, $Z = -2.8324$, $p = 0.0046$) (Figure 1). Whereas ergatoid males can enter alien nests (75% of the tested males were inside the nest of the adopting colony a few hours after introduction and tried to copulate with female sexuals), none of the female sexuals succeeded in entering the new nest. Moreover, 64% of them were killed within 24 hours after introduction and 96% did not survive for more than 3 days. This aggressiveness of workers against female sexuals can be observed in queen-right colonies without own winged females, as well (J.-L. Mercier, unpublished data).

Field observation

In the field the worker behaviour is totally different. Aggression of workers against alien female sexuals has never been observed. Instead, workers were observed carrying winged female sexuals from one nest to another. Female sexuals were carried above the worker, with folded legs and antennae, liberated on the nest entrance, and entered the nest. This carrying

behaviour is very frequent and was observed simultaneously during summer 2004 in the two locations of Montlouis sur Loire and Carennac. During a whole day of observation of nests in Montlouis sur Loire, workers were observed transporting females in a straight line from one colony to another 80 cm distant colony. A single winged female was carried from the first colony to the other each 4 minutes, from 10.00 am (soil $T^\circ = 31.5^\circ\text{C}$) to 6.30 pm (soil $T^\circ = 32^\circ\text{C}$; max T° during the day = 45°C). Thus, during this day, dozens of females had switched from the first nest to the second one. At the same time, the first nest received some females from other locations. This high activity of exchange of female sexuals seems to differ between days and nests.

Discussion

The genetic structure of the colonies of *C. elegans*, in accordance with our field data, confirms that this species is strictly monogynous. With the exception of one or two alien workers in five colonies, nestmate workers are usually offspring of a single queen and several males (4.52 ± 1.6 patriline). The real number of males that mated with the mother queen varied from 2 to 9 and was strongly correlated with effective paternity ($m_{e(p)} \text{ pop} = 4.37 \pm 1.65$). This means that the males that mated the queen contribute almost equally to the offspring. We like to point out that more than 6 patriline were found in three colonies by genotyping only nine or 10 workers (colonies P01, P02 and A01; Table 2), resulting in unrealistically high estimates for $m_{e(p)}$ and $m_{e,p}$ (values given in italics in Table 2). Although queens might mate with a large number of males (some *C. elegans* nests contain up to 17 ergatoid males), the genotyped workers might also have been offspring of multiple related queens. Dead queens may be replaced by one of the winged females of the colony (A. Schrempf & J. Heinze, unpublished data; J.-C. Lenoir & J.-L. Mercier, unpublished data), which are mainly its daughters and thus share the same alleles. Thus, even if the genotypes of the workers can be explained by a single queen, in a few cases two or more queens might have contributed one after the other to the worker offspring. This phenomenon could lead to an overestimation of the number of patriline in some colonies. Future genetic studies on *C. elegans* will therefore have to use a significantly increased number of workers. According to equation 8 in Tarpy and Nielsen (2002), sample size for the study of *C. elegans* should be larger than 17 individuals per colony. Nevertheless, except for the colonies mentioned above, the small difference between $m_{e(s)}$ and $m_{e(p)}$ indicates that the sampling error had no strong influence on the results (Tarpy & Nielsen 2002).

Multiply-mated mother queens produce colonies with an average worker relatedness of about 0.5 (Table 2). The positive inbreeding coefficient indicates that sexuals copulate with relatives in 70% of the copulations and thus about 1/3 of all matings involve unrelated partners. This is surprising, given that ergatoid males have long been considered to stay and mate inside their natal nests because of their winglessness and yellowish coloration (e.g., Forel 1892), and female sexuals found in the nests before spring dispersal were always mated. However, our genetic data show that colonies may adopt both alien males and alien female sexuals, which guarantees a certain degree of outbreeding (Table 3A: even if no alien male was detected in colony M38, half of the native females had sperm from alien males in their spermathecae). Although these results are based only on a small sample, they nevertheless reveal the same phenomenon in two independent populations. Studies with a larger number of genotyped sexuals are needed for a full understanding of the reproductive strategies and the frequency of the adoption of alien sexuals in this species.

The presence of foreign female sexuals in a nest is surprising because in laboratory tests they were attacked by workers and not allowed to enter (Figure 1). In contrast, workers were frequently observed to carry winged female sexuals from one nest to another in the field. We are at present not able to determine whether workers carry related female sexuals from their own colony to another one or whether they are capturing female sexuals from an alien colony and bring them back to their own. Whatever the direction of female trading, it appears to be sufficient to help female sexuals to enter nests containing unrelated males and workers.

The presence of unrelated males in a colony is more easily explained because workers do not behave aggressively towards alien males (Figure 1). Indeed, the adoption of alien males is common in ant species with mating inside the nests (Peeters 1991; Passera & Keller 1994). In the field, a few *C. elegans* males have been seen walking outside the nest (three observations), but male dispersal is probably difficult to observe due to their yellowish coloration and not very efficient because of high soil temperature, possible desiccation (males carry less than one third of the quantity of cuticular hydrocarbons of workers) and potential predation by the spider *Dyctina bicolor* (unpublished data). Workers carrying males have occasionally been seen at the end of the reproductive period (late September or October), but males were usually carried away from a nest and discarded, probably similar to the expulsion of supernumerary males from the hives of honey bees before winter (Morse *et al.* 1967; Free & Williams 1975; Page & Peng 2001).

In contrast, the exchange of individuals between neighbouring nests is commonly known from polydomous ant species. In such cases, monogynous colonies inhabit several queenless

satellite nests surrounding a queenright nest. Contrary, in *C. elegans*, all excavated nests were headed by a single queen and all workers of a nest were offspring of a single queen. Thus, different colonies are involved in the exchange of sexuals in this species.

The presence of many sexual intruders increases the gene flow in the population, lowers nestmate relatedness and counteracts the negative effects of inbreeding. Workers might develop a bet-hedging strategy and benefit from displacing some of their sexual sisters from their own nest, because of the high colony mortality in winter. Each year during the winter period, the temperature inside the nest decreases to less than 5°C, nests are inundated and buried by soil, and about 40% of the nests perish (Lenoir *et al.* in preparation). Dispersing sisters to other nests could permit the survival of one's genetic lineage in case the own nest is destroyed in winter. To determine the direction of carrying and the relations between nests that exchange females, we will in the future attempt to genotype the carrying worker and the carried winged females as well as investigate the genetic structure of the two nests that exchange females. In addition, the real proportion of alien sexuals hosted by a colony will be investigated in detail.

Partial sib-mating and pre-mating dispersal of wingless males and female sexuals probably characterizes the reproductive behaviour also of other monogynous species of *Cardiocondyla*. For example, Schrempf *et al.* (2005) indicate that female sexuals of *Cardiocondyla batesii* mate in their maternal nests before dispersing on foot (Heinze *et al.* 2002), but that one-fifth of all matings involve unrelated partners. Active displacement of female sexuals by workers and male dispersal can probably explain this fact.

The presence of foreign sexuals in a nest is puzzling: why do the workers take care of winged females that may be totally unrelated to them, both by the genotype of the female sexual as well as by the genotype of the sperm they are storing? Workers presumably benefit from adopting alien sexuals in that it leads to outbreeding of their sexual brothers and sisters and thus helps to avoid possible negative effects of inbreeding. These advantages might outweigh the cost of occasionally caring for an alien queen that has mated with an alien male. Furthermore, the low aggressiveness of workers against foreign sexuals inside the nest probably also comes from the fact that workers can no longer distinguish sexual sisters from foreign female sexuals after the latter have obtained the gestalt odour of the colony. The nest entrance then becomes the key point for workers to discriminate between females that are tolerated inside the nest and females to be rejected. Additional behavioural tests, such as introducing a female sexual together with native females into the nest or disturbing a nest and introducing an alien winged female when the nest reorganizes, could probably answer the

question. That the “adopting” colonies in our experiment did not contain males could also have biased worker behaviour. As males occur only in low numbers and sexuals do not develop in laboratory nests, it will be difficult to conduct similar experiments with colonies that house several males.

Our study also points out an interesting aspect of local mate competition. Whereas colonies of many other species of *Cardiocondyla* contain only a few, highly aggressive ergatoid males that fight for access to the female sexuals, nests of *C. elegans* and other monogynous species can house numerous ergatoid males ($= 5.27 \pm 4.31$; see also Arnoldi 1926 for *C. stambuloffii*; Marikovskiy & Yakushkin 1974 for *C. ulianini*, Schrempf *et al.* 2005 for *C. batesii*). The mean number of males present in colonies of *C. elegans* matches the mean number of males that mate with a queen (4.52 ± 1.6), suggesting that all males have equal access to the female sexuals. Males mating with the same female sexual participate equally in its offspring. Fighting among males has not been observed and the match between effective paternity and the observed number of patrilineages suggests that sperm competition is absent or low. *C. elegans* therefore appears to have returned to the seemingly peaceful mating system of other ant genera. Nests are probably too large in terms of space and number of workers, and harbour too many female sexuals for males being able to monopolize a harem (sex ratio: 0.91 ± 0.07 , $N = 34$). Furthermore, males can probably avoid competition when male numbers are too high by dispersing to other nests.

References

- Andersson N (1994) *Sexual selection* Princeton University Press, Princeton.
- Arnoldi KW (1926) Studien über die Variabilität der Ameisen. I. Die ökologische und die Familienvariabilität von *Cardiocondyla stambulowi* For. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 7, 254-278.
- Boomsma JJ, Baer B, Heinze J (2005) The evolution of male traits in social insects. *Annual Review of Entomology*, 50, 395-420.
- Boomsma JJ, Ratnieks FLW (1996) Paternity in eusocial hymenoptera. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B* 351, 947-975.
- Chapuisat M (1998) Mating frequency of ant queen with alternative dispersal strategies, as revealed by microsatellite analysis of sperm. *Molecular Ecology*, 7, 1097-1105.
- Cook JM, Compton SG, Herre EA, West SA (1997) Alternative mating tactics and extreme male dimorphism in fig wasps. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 264, 747-754.

- Cremer S, Heinze J (2003) Stress grows wings: Environmental induction of winged dispersal males in *Cardiocondyla* Ants. *Current Biology*, 13, 219-223.
- Cremer S, Lautenschläger B, Heinze J (2002a) A traditional stage between the ergatoid and winged male morph in the ant *Cardiocondyla obscurior*. *Insectes Sociaux*, 49, 221-228.
- Cremer S, Matthew FS, Heinze J (2002b) Male ants disguised by the queen's bouquet. *Nature*, 419, 897.
- Danforth BN (1991) The morphology and behavior of dimorphic males in *Perdita portalis* (Hymenoptera: Andrenidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 29, 235-247.
- Danforth BN, Desjardins CA (1999) Male dimorphism in *Perdita portalis* (Hymenoptera, Andrenidae) has arisen from preexisting allometric patterns. *Insectes Sociaux*, 46, 18-28.
- Danforth BN, Neff JL (1992) Male polymorphism and polyethism in *Perdita texana* (Hymenoptera: Andrenidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 85, 616-626.
- Errard C, Hefetz A (1997) Label familiarity and discriminatory ability of ants reared in mixed groups. *Insectes Sociaux*, 44, 189-198.
- Errard C, Ipinza Regla J, Hefetz A (2003) Interspecific recognition in Chilean parabiotic ant species. *Insectes Sociaux*, 50, 268-273.
- Foitzik S, Herbers J (2001) Colony structure of a slavemaking ant. 1. Intracolony relatedness, worker reproduction, and polydomy. *Evolution*, 55, 307-315.
- Forel A (1892) Die Ameisenfauna Bulgariens. *Verhandlungen der kaiserlich-königlich zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien*, 42, 305-318.
- Free JB, Williams IH (1975) Factors determining the rearing and rejection of drones by the honeybee colony. *Animal Behaviour*, 23, 650-675.
- Hamilton WD (1979) Wingless and fighting males in fig wasps and other insects. In: *Sexual selection and reproductive competition in insects* (eds. Blum MS, Blum NA), pp. 167-220. New-York: Academic, New-York.
- Heinze J, Hölldobler B (1993) Fighting for a harem of queen: Physiology of reproduction in *Cardiocondyla* male ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 8412-8414.
- Heinze J, Hölldobler B, Yamauchi K (1998) Male competition in *Cardiocondyla* ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42, 239-246.

- Heinze J, Schrempf A, Seifert B, Tinaut A (2002) Queen morphology and dispersal tactics in the ant *Cardiocondyla batesii*. *Insectes Sociaux*, 49, 129-132.
- Heinze J, Trindl A, Seifert B, Yamauchi K (2005) Evolution of male morphology in the ant genus *Cardiocondyla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 278-288.
- Kinomura K, Yamauchi K (1987) Fighting and mating behavior of dimorphic male in the ant *Cardiocondyla wroughtoni*. *Journal of Ethology*, 5, 75-81.
- Kukuk PF, Schwarz M (1988) Macrocephalic male bees as functional reproductives and probable guards. *Pan-Pacific Entomologist*, 64, 131-137.
- Lenoir J-C, Schrempf A, Lenoir A, Heinze J, Mercier J-L (2005) Five polymorphic microsatellite markers for the study of *Cardiocondyla elegans* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Molecular Ecology Notes*, 5, 565-566.
- Lewis PO, Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0. Free program distributed by the authors over the internet from <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>.
- Marikovskiy PI, Yakushkin VT (1974) The ant *Cardiocondyla uljanini* Em., 1889 and the systematic status of the "Xenometra parasitic ant". *Izvestia Akademii Nauk Kazakhskoi SSR, Seriya Biologicheskaya*, 3, 57-62.
- Moilanen A, Sundström L, Pedersen JS (2004) MateSoft: a program for deducing parental genotypes and estimating mating system statistics in haplodiploid species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 795-797.
- Morse RA, Strang GE, Nowakowski J (1967) Fall death rates of drone honey bee. *Journal of Economic Entomology*, 60, 1198-1202.
- Ottoni EB (2000) EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 32, 446-449.
- Page RE, Peng CY-S (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36, 695-711.
- Pamilo P (1985) Effect of inbreeding on genetic relatedness. *Hereditas*, 103, 195-200.
- Pamilo P (1993) Polyandry and allele frequency differences between the sexes in the ant *Formica aquilonia*. *Heredity*, 70, 472-480.
- Passera L, Keller L (1994) Mate availability and male dispersal in the Argentine ant *Linepithema humile* (Mayr). *Animal Behaviour*, 48, 361-369.
- Peeters CP (1991) The occurrence of sexual reproduction among ant workers. *Biological Journal of the Linnean Society*, 44, 141-152.

- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, 258-275.
- Schrempf A, Reber C, Tinaut A, Heinze J (2005) Inbreeding and local mate competition in the ant *Cardiocondyla batesii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57, 502-510.
- Starr CK (1984) Sperm competition, kinship, and sociality in the aculeate Hymenoptera. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems* (ed. Smith RL), pp. 427-464. Academic Press, Orlando, Florida.
- Stuart RJ, Francoeur A, Loiselle R (1987) Lethal fighting among dimorphic males of the ant, *Cardiocondyla wroughtonii*. *Naturwissenschaften*, 74, 548-549.
- Suzuki Y, Iwasa Y (1980) A sex ratio theory of gregarious parasitoids. *Researches on Population Ecology*, 11, 366-382.
- Tarpy DR, Nielsen DI (2002) Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95, 513-528.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Yamauchi K, Kimura Y, Corbara B, Kinomura K, Tsuji K (1996) Dimorphic ergatoid males and their reproductive behavior in the ponerine ant *Hypoponera bondroiti*. *Insectes Sociaux*, 43, 119-130.

Acknowledgments

We thank A. F. G. Bourke, P. D'Ettorre and the anonymous referees, for their comments on the manuscript. Our research was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (He 1623/12) and the project based personnel exchange program PROCOPE by DAAD and EGIDE.

Figure Legends

Figure 12: Aggression index of workers against introduced alien sexuals (number of introduced sexuals in brackets). Significant differences are indicated by different letters.

Tables and Figures

Table 2: F -Statistics for a total of 21 colonies computed with GDA (based on a three level analysis; Weir & Cockerham 1984). Confidence intervals (95%) are based on 5000 bootstrapping repetitions. Values for f (comparison of pairs of genes within an individual with random genes within the colonies; zero or negative in case individuals of the colony are related), F_{IS} (comparison of pairs of genes within an individual with random genes within the subpopulation; positive in case of inbreeding due to non-random mating) and F_{ST} (subpopulation compared to whole population; positive in case of limited gene flow) are given. F_{ST} within subpopulations is taking the population substructure into account (colony within subpopulation; positive in case individuals are related).

Locus	f	F_{IS}	F_{ST}	
			within subpopulations	between subpopulations
CE2-3A	-0.1459	0.2921	0.3822	0.1537
CE2-4A	-0.2919	0.2022	0.3825	0.1561
CE2-5D	0.0345	0.6580	0.6457	0.5721
CE2-12D	-0.2197	0.5587	0.6382	0.3056
CE2-4E	-0.3015	0.2013	0.3863	0.1812
Overall loci	-0.2114	0.3732	0.4826	0.2650
Upper 95% CI	-0.1077	0.5413	0.5896	0.4226
Lower 95% CI	-0.2872	0.2184	0.3832	0.1607

Table 3: Mating frequency and relatedness in colonies of *Cardiocondyla elegans*: Colony name, number of colonies (n_{colo}), number of genotyped individuals (n_{ind}) per colony. Mating frequency was estimated the minimum number of patriline (N). Effective paternity ($m_{e(s)}$ and $m_{e(s) \text{ pop}}$) following Starr (1984), $m_{e(p)}$ and $m_{e(p) \text{ pop}}$ corrected for non-sampling error following Pamilo (1993) with 95% confidence intervals, and $m_{e,p}$ corrected for non-sampling error and non-detection error due to inbreeding following Schrempf *et al.* (2005) are given, as well as the relatedness R with standard error from jackknifing and 95% confidence intervals.

Colony	n_{ind}	Starr 1984 Pamilo 1993 $\pm$ Tarpy & Nielsen 2002 Schrempf <i>et al.</i> 2005				Relatedness R		
		N : Minimum # of patriline	$m_{e(s)}$	$m_{e(p)} \pm 95\% \text{ C.I.}$	$m_{e,p}$		Jackknife	95% C.I.
M01	10	5	4.37	6.98 $\pm$ 2.10	7.81	0.4634	0.1611	0.4471
M02	10	3	2.95	3.77 $\pm$ 0.91	4.22	0.4120	0.1403	0.3894
M03	10	3	1.80	1.98 $\pm$ 0.91	2.21	0.4872	0.2278	0.6323
M04	10	4	3.37	4.57 $\pm$ 1.46	5.11	0.6755	0.1683	0.4673
M05	10	5	3.94	5.85 $\pm$ 2.10	6.55	0.4897	0.1351	0.3751
M07	10	3	1.61	1.73 $\pm$ 0.91	1.93	0.2428	0.1298	0.3603
M34	10	3	2.33	2.74 $\pm$ 0.91	3.06	0.5431	0.2569	0.7132
M37	10	4	3.90	5.75 $\pm$ 1.46	6.43	0.0852	0.1917	0.5320
M38	26	7	4.34	4.87 $\pm$ 1.01	5.45	0.1071	0.1093	0.3033
C01	10	5	4.37	6.98 $\pm$ 2.10	7.81	0.6047	0.1436	0.3988
C02	9	3	2.26	2.68 $\pm$ 1.02	3.00	0.6349	0.2017	0.5599
C03	10	4	3.39	4.62 $\pm$ 1.46	5.16	0.7829	0.1593	0.4423
C04	10	4	3.70	5.29 $\pm$ 1.46	5.92	0.4698	0.2331	0.6469
C29	10	5	3.65	5.17 $\pm$ 2.10	5.79	0.6831	0.0455	0.1263
P01	10	6	6.97	20.74 $\pm$ 2.83	23.20	0.4773	0.1271	0.3529
P02	10	9	8.33	45.00 $\pm$ 5.50	50.35	0.2983	0.2112	0.5862
P03	9	5	4.66	8.58 $\pm$ 2.36	9.60	0.5365	0.2840	0.7885
A01	9	6	5.79	14.42 $\pm$ 3.18	16.14	0.2097	0.2514	0.6980
A02	9	4	3.12	4.24 $\pm$ 1.64	4.75	0.3824	0.1473	0.4089
A05	10	2	1.98	2.22 $\pm$ 0.47	2.48	0.6485	0.2663	0.7394
A07	8	5	3.90	6.65 $\pm$ 2.69	7.44	0.1030	0.1261	0.3501
$n_{\text{colo}} = 21$	10.76 $\pm$ 4.90	4.52 $\pm$ 1.6	$m_{e(s) \text{ pop}} = 3.25$	$m_{e(p) \text{ pop}} = 4.37 \pm 1.65$	8.78 $\pm$ 10.71	0.49 $\pm$ 0.06		

Table 4: A) Proportion (and full number) of native and alien sexuals found in two *C. elegans* nests (M38 - Indre et Loire, A01 - Allier). The sperm in the spermatheca of winged female sexuals was genotyped to determine if they had mated with males from the nest where they were found (natives) or alien males. The sperm of seven female sexuals from colony A01 could not be genotyped because of technical problems. Of the remaining three, all had mated with native males and the spermatheca of one female in addition contained sperm from at least an alien male. B) Genotypes of some female sexuals (native / alien) found in colony M38 and their mates. Alleles, which are incompatible with the resident queen's genotype, are given in bold.

A

		males	winged females		spermatozooids (native/alien)
M38	native	100% (3)	60% (6)	>	50% / 50% (3 / 3)
	alien		40% (4)	>	25% / 75% (1 / 3)
A01	native	75% (6)	0%		
	alien	25% (2)	100% (10)	>	100% / 33% (3 / 1)

B

Locus	CE2-3A	CE2-4A	CE2-5D	CE2-12D	CE2-4E
Queen genotype of the colony M38 (inferred from the genotype of workers)	119 / 121	184 / 186	208 / 210	136 / 138	139 / 145
Native female	103 / 121	184 / 184	208 / 210	138 / 138	145 / 145
alleles found after sperm amplification: native males	119 / 121	186	208	136 / 138	145
Native female	103 / 121	184 / 186	208 / 210	136 / 138	145 / 145
alleles found after sperm amplification: alien males	119 / 121	184 / 186	208 / 210	138	143
Alien female	103 / 119	186 / 186	208 / 210	136 / 138	143 / 157
alleles found after sperm amplification: native males	119 / 121	184 / 186	208 / 210	138	145
Alien female	103 / 121	184 / 184	208 / 210	136 / 138	143 / 157
alleles found after sperm amplification: alien males	119 / 121	186	208	138	143

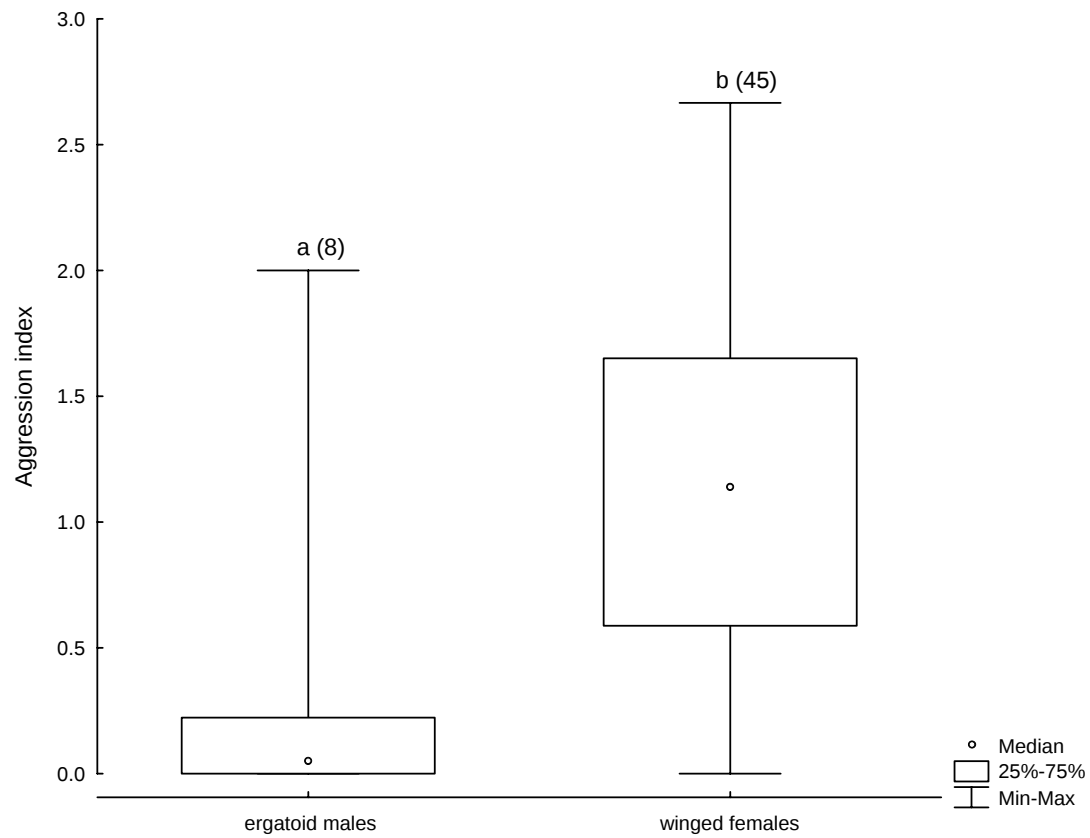


Figure 1

Appendix: Allele frequencies in the 5 investigated microsatellite loci from the workers of the 3 studied populations. Alleles are identified by their length (bp). Numbers in brackets indicate how often an allele was found in female sexuals.

Alleles	Location		
	Loire	Dordogne	Allier
CE2-3A			
103	0.135		0.167
105			0.093
107	-	-	(1)
109	0.006	0.015	
111		0.041	0.424
113			0.017
115		0.143	
117	0.011	0.014	0.030
119	0.316	0.585	0.051
121	0.414	0.095	0.218
123	0.090		
125	0.028		
129		0.108	
CE2-4A			
178			0.382
182		0.201	
184	0.429	0.155	0.175
186	0.106	0.008	0.325
188		0.286	0.102
190		0.095	0.017
192	0.464	0.255	
CE2-5D			
204		0.148	0.017
206	0.045	0.736	0.799
208	0.906	0.116	0.184
210	0.049		
CE2-12D			
124		0.403	
128			0.102
130	0.030		0.016
132		0.165	0.113
134	0.106	0.126	0.455
136	0.044	0.214	0.157
138	0.820	0.093	
140			0.157
148	-	-	(1)
CE2-4E			
139	0.016	0.020	
141		0.054	
143	0.011		
145	0.398	0.074	
147	-	-	(2)
149		0.114	0.500
151	-	-	(1)
153	0.016	0.392	
155	0.049	0.126	
157	0.170		
159	0.300		
161	0.032	0.033	0.500
163	0.008		
165		0.033	
173		0.013	
175		0.141	

Discussion

Structure sociale

Environnement, survie et distribution spatiale

L'environnement dans lequel se développe *C. elegans* est temporaire parce qu'il est en évolution rapide. Il correspond à un moment particulier de la fixation des grèves du fleuve. En analysant les conditions de vie correspondant à ce moment, nous avons montré qu'elles sont contraignantes. *C. elegans* est la seule espèce de fourmi connue qui arrive à s'y adapter. Nous avons vu que la composition des sédiments était particulière : moins de 60% de sable fin, au moins 20% de galets et toujours environ 25% de gravier (Figure 4, Article 1). Même pendant les fortes périodes d'ensoleillement, la température des sédiments où les fourmis creusent leurs chambres ne dépasse pas 30°C. Les variations quotidiennes de température y sont aussi tamponnées, particulièrement dans les couches les plus profondes des sédiments. Les sondes d'humidité placées dans les sédiments indiquent que les pluies s'infiltrent très vite et que la teneur en eau du sol augmente peu et sur une période très courte. Au contraire, les crues provoquent une très forte augmentation de la quantité d'eau dans les sédiments et durent souvent plusieurs jours. Elles correspondent à une remontée de la nappe alluviale durant laquelle la structure du sol permet de créer des poches d'air au niveau des chambres du nid. Certains nids peuvent ainsi résister aux crues. L'architecture même des nids entre également en ligne de compte dans la survie des nids. Les chambres sont très souvent placées sous des particules de sol de forte granulométrie (cailloux de diamètre supérieur à 2 cm), aidant la capture de poches d'air ; les grains de sable des murs des chambres sont collés les uns aux autres, augmentant la tension de surface de l'eau environnante, ce qui l'empêche d'entrer. Enfin, certaines chambres possèdent des constructions rappelant une margelle de puit pour prévenir l'inondation des chambres sous-jacentes. Ce type de construction a également été décrit chez *Cardiocondyla batesii* (Heinze *et al.* 2006). Cette dernière espèce est extrêmement proche de *C. elegans*. Elle est également terricole (Schrempf *et al.* 2005) même si elle vit dans un sol plus argileux et pas forcément près d'un cours d'eau. Comme *C. elegans*, elle est monogyne et ne possède que des males ergatoïdes qui par contre sont généralement moins nombreux.

La granulométrie des sédiments confère à la grève une structure qui n'est que très peu remaniée par les forts courants des crues. La végétation ligneuse se développant bien sur ce

milieu, elle participe d'ailleurs à l'accumulation d'alluvions fines lors des décrues, ce qui induit une stabilisation de plus en plus forte des grèves (Rodrigues *et al.* 2006). Seules les crues d'amplitude exceptionnelle sont capables de détruire cet environnement. Lors de crues d'amplitude normale, environ 40% des nids de *C. elegans* disparaissent (Figure 2, Article 2). La distribution aléatoire de ces nids disparus indique que ce n'est pas le remaniement des sédiments qui est responsable de cette mortalité. La structure du nid elle-même est donc très certainement en cause. Mal construites ou mal entretenues, les chambres n'ont pas dû être suffisamment imperméables, noyant leur occupantes. Une autre hypothèse pourrait être que les nids les plus peuplés pourraient souffrir de l'augmentation plus rapide du CO₂ à l'intérieur des chambres, les fourmis mourant alors par asphyxie. Ces hypothèses ne sont bien entendu pas exclusives.

Les femelles fécondées qui ont survécu à l'hiver font un vol de dispersion puis fondent de nouveaux nids qui prennent la place des nids disparus. Chaque année en fin d'été, le site que nous avons étudié est saturé par une densité de nids de 1 nid/m². Cette densité de nids a également été observée chez des populations de *C. batesii* dans les environs de Granada en Espagne (Schrempf *et al.* 2005). La population de nids de *C. elegans* observée ne se distribue pas aléatoirement dans l'espace. Les nids optimisent la distance qui les sépare de leurs proches voisins. La population est alors distribuée de façon dispersée. Nous pensons que *C. elegans* suit les mêmes règles que celles observées chez d'autres genres de fourmis comme des *Pogonomyrmex* ou des *Messor* (Gordon 1993 ; Pfennig 1995 ; Gordon & Kulig 1996 ; Warburg & Steinberger 1997) où l'espacement dépend de la densité de la population. Les nids déjà établis ont un fort impact sur l'emplacement des jeunes fondations. Ils éliminent les jeunes colonies qui s'installent trop près (Ryti & Case 1992).

Stratégie de reproduction

Structure génétique

Nos études sur la structure génétique des nids de *C. elegans* nous ont permis de confirmer la monogynie de cette espèce. Elles ont également permis de mettre en évidence que toutes les sociétés sont issues de reines polyandres ayant été fécondées par $4,76 \pm 1,87$ mâles. Comme les habitats propices à l'établissement des colonies sont dispersés, il n'y a pratiquement pas de flux génétique entre eux. Une information tout d'abord surprenante concernant la structure génétique des colonies est que l'apparentement entre les ouvrières implique qu'un tiers des

accouplements se déroule entre partenaires sexuels non apparentés (Article 4, Table 1). Cette constatation prend tout son sens lorsque l'on observe au laboratoire le comportement des ouvrières face aux individus sexués. Les mâles, quelle que soit leur provenance, sont toujours tolérés par les ouvrières. Ils peuvent ainsi facilement pénétrer une colonie étrangère. Les femelles ailées, par contre, font l'objet d'une intense agression lorsqu'elles se présentent seules à l'entrée d'un nid étranger. Cependant, en observant la composition génétique d'une partie des sexués de nids de *C. elegans*, nous avons montré que des sexués étrangers, des mâles tout comme des femelles ailées, sont présents dans ces nids. Alors que la présence de mâles n'appelle aucune interrogation particulière puisqu'ils ne sont pas agressés, celle des femelles est en contradiction avec les résultats des tests précédents. Le comportement des ouvrières sur le terrain permet d'expliquer la présence de ces femelles dans des nids étrangers. En effet, certaines ouvrières développent un comportement de transport de femelles ailées d'une colonie vers une autre. La femelle ainsi transportée ne subit aucune agression de la part des ouvrières de la colonie dans laquelle elle pénètre. Nous ne sommes pas encore en mesure de dire dans quel sens s'effectue ce transfert de femelles. Deux hypothèses sont envisageables :

1) L'ouvrière transporteuse disperse l'une de ses sœurs. Si tel est le cas, elle développerait une stratégie permettant d'éviter une trop forte consanguinité entre sa sœur fertile et les partenaires sexuels qu'elle va rencontrer, et placerait ainsi des individus lui étant apparentés dans plusieurs nids, leur donnant donc plus de chances de survivre à l'hiver ainsi qu'aux crues (cf. paragraphe précédent).

2) La transporteuse viendrait capturer des femelles étrangères, les ramènerait dans son nid et permettrait ainsi à ses frères de s'accoupler avec des femelles non apparentées.

Bien que nous ne privilégions actuellement aucune de ces deux hypothèses, la première semble la plus vraisemblable. Elle aurait en effet un double intérêt : éviter une trop forte consanguinité dans les accouplements des femelles ailées et développer pour la colonie une stratégie de « bet-hedging » (« ne pas mettre tous ses œufs dans le même panier ») (Hopper 1999 ; West-Eberhard 2003). En répartissant leurs sœurs dans les nids environnants, les ouvrières s'assurent qu'au moins une partie d'entre-elles survivront aux crues.

Sexe ratio

Chez les fourmis, le sexe ratio opérationnel est très souvent extrêmement biaisé en faveur des mâles. Ce n'est pas le cas chez *C. elegans*. Le nombre d'accouplements effectifs dans cette

espèce est de $m_e = 3,27$. L'apparementement entre les ouvrières est donc théoriquement de $r = 0,25 + (0,5 / m_e) = 0,40$. Cette valeur est confirmée par les calculs effectués par le logiciel Relatedness ($r = 0,49 \pm 0,06$; Article 4, Tableau 2). Le sexe ratio secondaire attendu est donc de 0,62 (1,6:1 ; F:M). Or le sexe ratio opérationnel observé dans les colonies possédant à la fois des mâles et des femelles est de 0,91 (10,1:1). L'asymétrie d'investissement énergétique dans les deux sexes ne peut pas à lui seul expliquer cette différence. Même si les mâles sont de poids équivalent aux ouvrières (poids frais d'une ouvrière = 0,252 mg ; moyenne sur un groupe de 100 ouvrières), et sont donc 2,5 fois moins lourds que les femelles ailées (poids frais d'une femelle ailée = 0,633 mg ; moyenne sur un groupe de 40 femelles ailées), ils n'en restent certainement pas moins coûteux à mettre en place à cause de leur spermatogenèse qui sera fonctionnelle durant toute leur vie, leur permettant ainsi de copuler avec les mêmes femelles plusieurs fois. Ce seul caractère apporte un tel avantage reproductif aux mâles qu'il représente très certainement le facteur principal permettant d'expliquer le sexe ratio opérationnel extrêmement biaisé envers les femelles chez *C. elegans*. Ainsi, le faible nombre de mâles rencontrés dans la colonie est suffisant, puisqu'il est très rare de trouver des femelles ailées dont la spermathèque ne contient pas de spermatozoïdes en fin de période de reproduction.

Compétition locale pour l'accès aux femelles (Local Mate Competition) – tolérance entre mâles

Une question concernant certaines espèces de *Cardiocondyla* telles que *C. elegans*, *C. batesii* ou encore *C. ulianini* est souvent posée : pourquoi les mâles ergatoïdes de ces espèces sont-ils mutuellement tolérants alors que ceux de nombreuses autres espèces sont extrêmement agressifs et armés pour tuer leurs rivaux aussi bien au stade larvaire qu'adulte ? Le fait que les mâles puissent changer de nid apporte certainement un élément de réponse à cette question. Chez *Cardiocondyla obscurior*, certaines colonies sont polygynes alors que d'autres sont strictement monogynes. Le nombre de reines ne semble pas influencer la production de mâles ailés (toujours tolérants envers tous les types de mâles) mais les colonies monogynes produisent en moyenne deux fois moins de mâles ergatoïdes que les colonies polygynes (Figure 13) (Cremer & Heinze 2002). D'après Passera & Aron (2005) la compétition sexuelle est forte dans les colonies monogynes, d'où un nombre de mâles ergatoïdes plus faible, car ces derniers sont tous issus de la même reine et sont donc très apparentés. Par contre, dans un

système polygyne, les mâles ergatoïdes étant moins apparentés, la compétition entre eux est moins forte et il est ainsi possible d'en avoir plus dans le même nid.

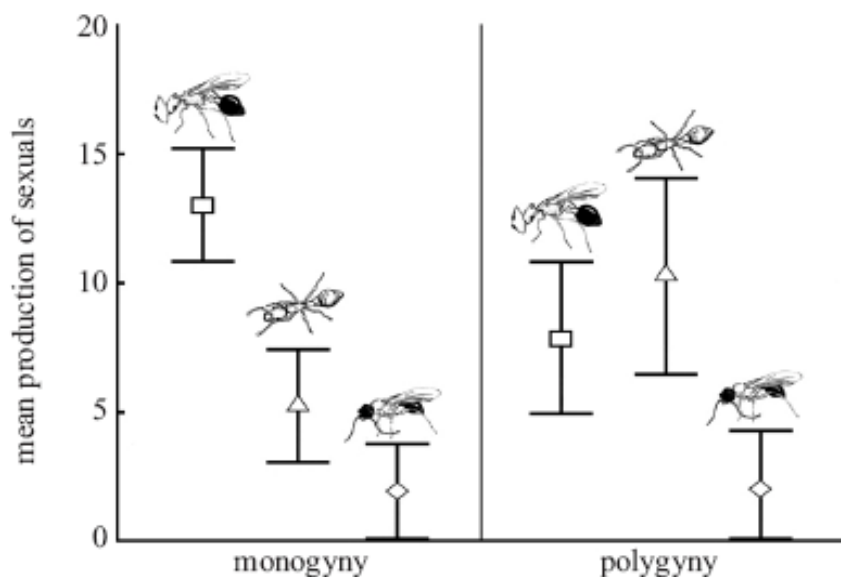


Figure 13. Production moyenne des sexués (femelles ailées (carrés), mâles ergatoïdes (triangles) et mâles ailés (losanges)) dans des colonies monogynes et polygynes de *Cardiocondyla obscurior*. D'après Cremer & Heinze (2002).

Bien que nous ayons montré que *C. elegans* présente des colonies strictement monogynes, les mâles (aptères) peuvent facilement entrer dans un nid étranger pour avoir accès aux femelles qui s'y trouvent. L'apparement entre ces mâles venus de différents nids est donc faible. De plus, dans ces conditions, tous les mâles semblent pouvoir copuler avec toutes les femelles ailées du nid où ils se trouvent. En effet, le nombre moyen de mâles retrouvés dans les nids ($5,27 \pm 4,31$) n'est pas significativement différent du nombre moyen de mâles qui fécondent une femelle ($4,76 \pm 1,87$). Après avoir copulé avec la même femelle, chaque mâle participe de façon équivalente à la descendance de cette femelle : le nombre de fratries qui compose les colonies n'est pas différent du nombre d'accouplements effectif (m_e) de la reine. Il n'y a donc vraisemblablement pas de compétition spermatique ou de manipulation du sperme par la femelle lors de la fécondation des œufs. La compétition entre les mâles d'un nid pour l'accès aux femelles est donc très faible, ce qui explique la présence de « nombreux » mâles chez *C. elegans*. Un mécanisme similaire doit se produire chez *C. batesii* qui possède également des mâles ergatoïdes tolérants. Dans cette espèce, 1/5 des accouplements font intervenir des partenaires génétiquement peu apparentés (Schrempf *et al.* 2005). Le passage potentiel de mâles d'un nid à l'autre pourrait expliquer la tolérance des mâles et l'« outbreeding » observé.

Chez *Cardiocondyla*, la compétition pour l'accès aux femelles est invoquée pour expliquer le biais du sexe ratio en faveur des femelles, et les liens de parenté servent à expliquer la tolérance observée entre mâles ergatoïdes (Boomsma *et al.* 2005). Ainsi, tant que les mâles sont frères, ils sont tolérants et leur nombre est limité à celui juste suffisant pour inséminer l'ensemble des femelles disponibles. Si le nombre de ces mâles augmente, ils entrent en compétition. Les mâles surnuméraires sont alors éliminés et le nombre de mâles et leur tolérance se maintiennent. En cas de polygynie, les mâles ergatoïdes sont non apparentés. Ces derniers essaient alors de maximiser leur nombre d'accouplements en monopolisant les femelles et en éliminant leurs rivaux. Les mâles sont donc dans ce cas agressifs et peu nombreux. Ce cadre théorique ne correspond absolument pas à *C. elegans*. Les mâles présents dans les nids ne sont pas forcément apparentés, pourtant ils sont tolérants. Nous expliquons cette absence d'agressivité par une absence de compétition locale pour l'accès aux femelles entre les mâles non apparentés puisqu'ils peuvent y « échapper » en changeant de nid. Ils adoptent ainsi le comportement tolérant que l'on retrouve chez les mâles ailés. Anderson *et al.* (2003), dans leur travail théorique, prédisaient déjà cette augmentation du nombre de mâles ergatoïdes (et donc implicitement leur plus grande tolérance) si ces derniers pouvaient quitter leurs nids.

Espèce invasive et/ou bio-indicatrice des grèves du fleuve Loire ?

Il semble que *C. elegans* possède des caractères dérivés par rapport aux autres espèces du même genre. Les colonies sont monogynes, les mâles ailés ont disparu et les mâles ergatoïdes sont tolérants entre eux. Si l'on compare les autres critères caractérisant les espèces invasives avec la biologie de *C. elegans*, les conditions les plus importantes ne sont pas satisfaites. En effet, cette espèce est certes de petite taille avec une complète stérilité des ouvrières, le régime alimentaire est bien opportuniste et les accouplements ont bel et bien lieu à l'intérieur des nids. Cependant les conditions d'unicolonialité, de polygynie, et de reproduction des nids par bouturage ne sont pas des caractéristiques de *C. elegans*. A l'inverse, malgré une faible agression entre ouvrières étrangères, les nids restent très fermés, toutes les ouvrières étant issues d'une seule reine (monogynie). Enfin, les nouvelles colonies sont fondées par une seule femelle de façon semi-claustrale. Si l'on ajoute à ces caractéristiques les faibles capacités de compétition de *C. elegans* par rapport aux autres espèces de fourmis qu'elle peut rencontrer, il semble peu raisonnable de la considérer comme une espèce invasive. De ce point de vue, elle se détache donc de plusieurs autres espèces du même genre (Heinze *et al.* 2006).

Afin de mieux gérer les écosystèmes ligériens, il faut savoir reconnaître les environnements et pouvoir prédire leur évolution. Les communautés végétales permettent en général de qualifier le milieu qu'elles colonisent. Cela nécessite cependant l'identification de plusieurs espèces. A titre d'exemple, le milieu étudié ici regroupe au moins 8 espèces de plantes appartenant à 4 communautés phytosociologiques différentes, allant des herbacées du lit mineur aux plantes caractéristiques des prairies, landes, friches et autres communautés à l'écart du lit mineur. Il est difficile dans ces conditions de statuer sur l'étape évolutive de l'environnement étudié. A force de recoupements, il est cependant possible d'identifier ces grèves comme étant dans les premiers stades de fixation (Code Natura 2000 : 6120 Communautés pionnières à post-pionnières sur sables silico-calcaires à calcaires, plus ou moins fixés). *C. elegans* étant pionnière dans cet environnement, sa seule présence permet de caractériser cette étape de l'évolution morphologique des chenaux secondaires de la Loire.

L'avenir des grèves où se retrouve *C. elegans* peut aussi être prédit. Le milieu étant en cours de fixation, la végétation rase va s'y développer, permettant l'accumulation d'alluvions fines. Ceci a également pour effet de diminuer la température de la surface du sol grâce à l'ombre procurée par les plantes. D'autres espèces de fourmis telles que *Tetramorium caespitum* ou encore *Lasius niger* vont alors pouvoir se développer et entrer en compétition avec *C. elegans*. Bien plus efficaces dans la récolte de nourriture, elles provoquent le déclin progressif des populations de *C. elegans*. Un exemple est donné au niveau du bras secondaire de la rive gauche à la hauteur de Montlouis-sur-Loire (Figure 14).



Figure 14. Chenal secondaire sur la rive gauche de la Loire à la hauteur de Montlouis-sur-Loire. La grève du second plan est en cours de fixation, *C. elegans* est la seule espèce de fourmi à s'y développer avec une forte densité de 1 nid/m². La grève du premier plan est végétalisée depuis peu de temps, la population de *C. elegans* y a fortement chuté, seuls quelques nids sont encore visibles alors que d'autres espèces de fourmis sont apparues. Date du cliché : Juillet 2005.

La grève visible dans le second plan de cette figure représente le site d'étude principal de cette thèse. Située à quelques dizaines de mètres du lit mineur de la Loire, elle supporte exclusivement une très forte population de *C. elegans*. Elle est actuellement en cours de stabilisation. La grève visible en premier plan de la Figure 14 est maintenant très stable et bien végétalisée. Une forte population de *C. elegans* y était bien développée il y a encore 5 ans. Aujourd'hui, en même temps qu'une végétation plus abondante, d'autres espèces de fourmis s'y sont installées, contraignant *C. elegans* à céder la place. La Figure 2 en introduction représente cette même zone durant la crue décennale de Décembre 2003.

Conclusion

Ces premières études de terrain et de laboratoire sur *Cardiocondyla elegans* ont mis en lumière le potentiel exceptionnel de cette espèce et plus largement de ce genre, du point de vue des « particularités » de l'espèce ou de son intérêt pour tester certains concepts théoriques. La Figure 15 ci-dessous tente de résumer l'ensemble des travaux entrepris durant cette thèse. Nous avons ainsi vu comment les facteurs abiotiques pouvaient façonner l'environnement, influençant l'établissement et le développement des populations de cette fourmi. Nous avons aussi découvert chez cette espèce une stratégie de reproduction originale chez les fourmis. Ces caractéristiques font de *C. elegans* un organisme extrêmement adapté à son environnement et donc spécifique de celui-ci. Enfin, la présence exclusive de cette espèce de fourmi permet de définir l'étape de fixation des grèves de la Loire, de caractériser l'évolution morphologique de ses chenaux secondaires.

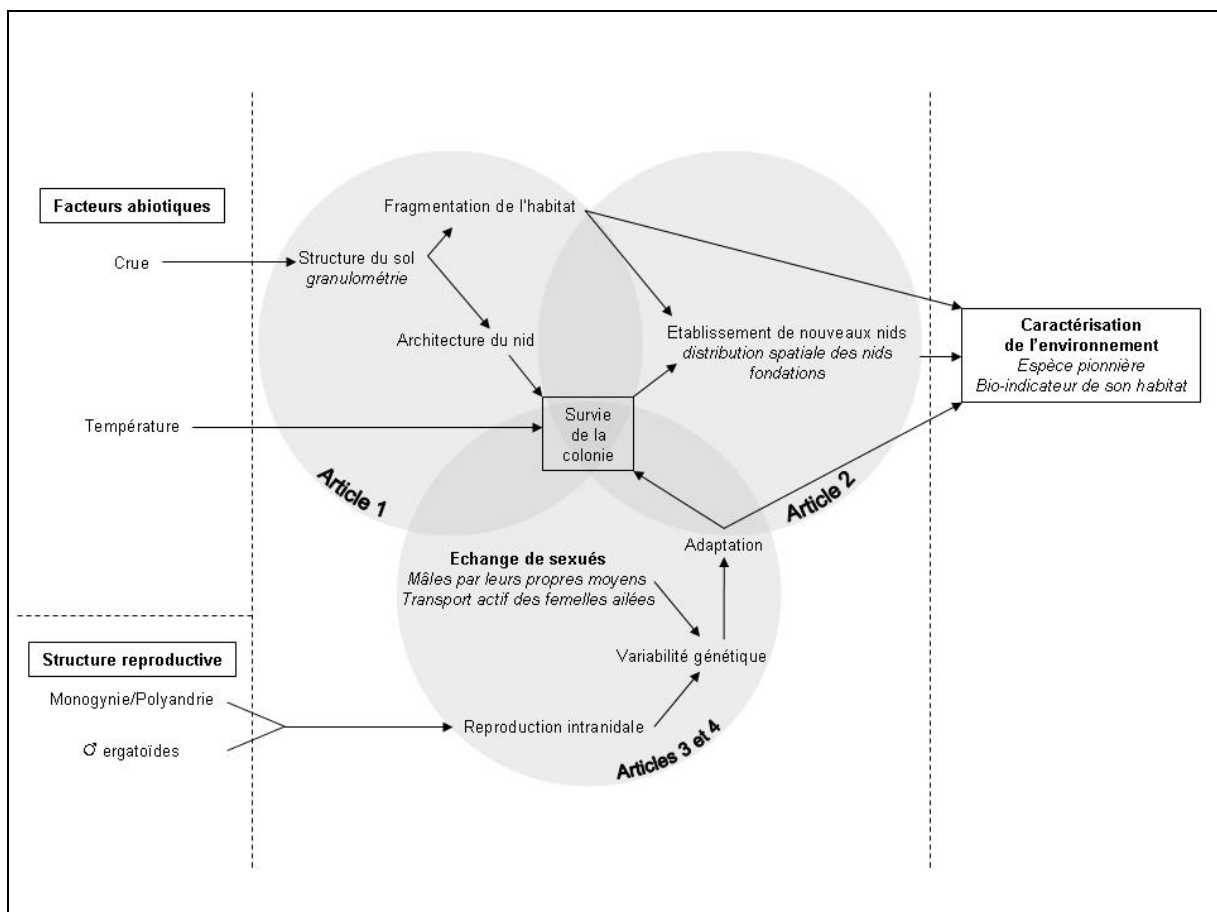


Figure 15. Schéma récapitulant les travaux effectués durant cette thèse sur *C. elegans*.

Perspectives

Ce travail a donné de nombreuses réponses aux questions que nous nous étions posées et il ouvre aussi de nombreuses perspectives. Si l'on reprend les travaux comme ils sont présentés dans ce manuscrit :

1) Il serait intéressant de définir la nature du matériau qui maintient les grains de sable des chambres liés les uns aux autres (salive, fèces (comme chez les termites), utilisation d'un mycélium, culture bactérienne ?). C'est probablement un des avantages considérables de cette espèce qui explique sa survie en zone inondée et que n'ont pas les *Lasius* ou *Tetramorium*. Un travail sur les propriétés physiques que cette « substance » procure aux chambres dans un environnement humide (voire submergé) pourrait également être envisagé.

2) L'influence des nids établis sur la réussite des jeunes fondations reste à démontrer de façon formelle (voir Article 2). Une seule pré-expérimentation a été menée, connectant deux nids de laboratoire à une même aire de récolte. Quelques heures ont suffi à l'un des deux nids pour exterminer son concurrent.

3) Les résultats présentés dans les Article 3 et 4 sont encourageant. Toutefois, de plus amples analyses génétiques demandent à être conduites sur des nids d'une même population dont la distance est connue afin de déterminer les relations qui existent entre colonies proches. L'analyse génétique de nids échangeant des femelles ailées, ainsi que les relations de parenté qui lient une ouvrière transporteuse et une femelle ailée transportée semble indispensable. Il faudrait aussi refaire des analyses génétiques sur les sexués (et sur le sperme contenu dans la spermathèque des femelles ailées) en utilisant un nombre important de colonies afin de définir plus précisément quelle est la proportion de sexués étrangers dans un nid.

En laboratoire, des adoptions de femelles ailées par des colonies orphelines ont été réalisées. L'hypothèse selon laquelle des colonies pourraient suppléer la mort de leur reine par l'adoption d'une femelle étrangère demande à être vérifiée par l'analyse génétique des reines de plusieurs colonies

4) Les mâles ergatoïdes de *C. elegans* présentent également un grand intérêt du point de vue de leur comportement sexuel. Une étude fine de leur parade sexuelle est en cours, pour être ensuite comparée, dans un contexte évolutif, à celle d'espèces dont les mâles ergatoïdes sont agressifs ainsi qu'à celle de mâles ailés.

5) Des travaux, actuellement en cours, montrent une différence qualitative de « l'odeur cuticulaire » des femelles ailées par rapport aux ouvrières et mâles. Nous avons montré que certains produits (alcools à longues chaînes carbonées) étaient spécifiques des ailes des femelles ailées. L'implication de ces odeurs dans la reconnaissance du partenaire sexuel pourrait être testée.

Enfin, 6) la population principale étudiée ici est ligérienne et le statut d'espèce indicatrice du milieu reste limité pour l'instant à cette zone. Des études sur la présence de *C. elegans* dans d'autres environnements tels que les bords de l'Allier, de la Dordogne ou de la Durance (qui présentent des substrats comparables) permettraient de statuer sur la possibilité d'utiliser cette espèce comme bio-indicatrice des milieux régulièrement inondés en cours de stabilisation. Elle pourrait alors constituer un outil simple et pratique dans l'aide à la gestion de ces habitats protégés.

Références bibliographiques

- Andersen A.N. (1997) Ants as indicators of restoration success following mining: a functional group approach. In: *Conservation outside nature reserves* (eds. Hale P & Lamb D), pp. 319-325. Centre for Conservation Biology, University of Queensland, Queensland, Australia
- Anderson C., Cremer S. & Heinze J. (2003) Live and let die : why fighter males of the ant *Cardiocondyla* kill each other but tolerate their winged rivals. *Behavioral Ecology*, 14, 54-62.
- Andersson N. (1994) *Sexual selection*. Princeton University Press, Princeton. pp.599.
- Bacchi M. (2000) *Structure et dynamique des peuplements macrobentiques en Loire. Impact des facteurs hydrologiques et sédimentaires*. Université François Rabelais, Tours. Docotorat pp.251.
- Baroni Urbani C. (1973) Die Gattung *Xenometra*, ein objektives synonym. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologica Gesellchaft*, 46, 199-201.
- Bernard F. (1968) *Faune de l'Europe et du bassin méditerranéen*. Masson et Cie, Paris. pp.411.
- Blandin P. (1986) Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'Ecologie*, 17, 21-307.
- Boake C.R.B. (2000) Flying apart: mating behaviour and speciation. *Bioscience*, 50, 501-508.
- Boake C.R.B. (2005) Sexual selection and speciation in hawaiian *Drosophila*. *Behavior Genetics*, 35, 297-303.
- Boomsma J.J. (1989) Sex-investment ratios in ants: has female bias been systematically overestimated? *American Naturalist*, 133, 517-532.
- Boomsma J.J., Baer B. & Heinze J. (2005) The evolution of male traits in social insects. *Annual Review of Entolomogy*, 50, 395-420.
- Bourke A.F.G. & Franks N.R. (1995) *Social evolution in ants*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. pp.529.
- Bourke A.F.G. & Ratnieks F.L.W. (2001) Kin-selected conflict in the bumble-bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Proceedings of The Royal Society of London. Series B*, 268, 347-355.
- Brown K.S. (1997) Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: insects as indicators for conservation monitoring. *Journal of Insect Conservation*, 1, 25-42.

- Cornier T. (2002) *La végétation alluviale de la Loire entre le Charolais et l'Anjou : essai de modélisation de l'hydrosystème*. Université de Tours, Tours. pp.227.
- Cremer S. & Heinze J. (2002) Adaptive production of fighter males: queens of the ant *Cardiocondyla* adjust the sex ratio under local mate competition. *Proceedings of The Royal Society of London. Series B*, 269, 417-422.
- Cremer S. & Heinze J. (2003) Stress grows wings: Environmental induction of winged dispersal males in *Cardiocondyla* Ants. *Current Biology*, 13, 219-223.
- Cremer S., Lautenschläger B. & Heinze J. (2002a) A traditional stage between the ergatoid and winged male morph in the ant *Cardiocondyla obscurior*. *Insectes Sociaux*, 49, 221-228.
- Cremer S., Matthew F.S. & Heinze J. (2002b) Male ants disguised by the queen's bouquet. *Nature*, 419, 897.
- Crozier R.H. & Pamilo P. (1996) *Evolution of social insect societies. Sex allocation and kin selection*. Oxford University Press, Oxford.
- D'Ettorre P., Heinze J. & Ratnieks F.L.W. (2004) Worker policing by egg eating in the ponerine ant *Pachycondyla inversa*. *Proceedings of The Royal Society of London. Series B*, 271, 1427-1434.
- Darwin C. (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. Murray, London.
- Duchateau M.J. & Velthuis H.H.W. (1988) Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris*. *Behaviour*, 107, 186-207.
- Echaubard M. (1995) *Les animaux comme indicateurs biologiques de pollution*, Chinon. 21-22 septembre. pp.335-358.
- Emlen D.J., Marangelo J., Ball B. & Cunningham C.W. (2005) Diversity in the weapons of sexual selection: horn evolution in the beetle genus *Onthophagus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Evolution*, 59, 1060-1084.
- Endler A., Liebig J. & Hölldobler B. (2006) Queen fertility, egg marking and colony size in the ant *Camponotus floridanus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59, 490-499.
- Fisher R.A. (1930) *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Foitzik S., Heinze J., Oberstadt B. & Herbers J.M. (2002) Mate guarding and alternative reproductive tactics in the ant *Hypoconerops opacior*. *Animal Behaviour*, 63, 597-604.
- Fournier D., Estoup A., Foucaud J., Jourdan H., Le Breton J. & Keller L. (2005) Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature*, 435, 1230-1234.
- Free J.B. & Williams I.H. (1975) Factors determining the rearing and rejection of drones by the honeybee colony. *Animal Behaviour*, 23, 650-675.

- Gaultier S. (2000) *Etude de l'évolution géomorphologique dynamique de la Loire à Bréhémont*. Université d'Orléans, Orléans. Doctorat pp.130.
- Gervet J. (1964) La ponte et sa régulation dans la société polygine de *Polistes gallicus* L. *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et biologie animale*, 6, 601-778.
- Gordon D.M. (1993) The spatial scale of seed collection by harvester ants. *Oecologia*, 95, 479-487.
- Gordon D.M. & Kulig A.W. (1996) Founding, foraging, and fighting: colony size and the spatial distribution of harvester ant nests. *Ecology*, 77, 2393-2409.
- Grosbois C. (1998) *Géochimie des eaux de la Loire : contributions naturelles et anthropiques. Quantification de l'érosion*. Université de Tours, Tours. pp.232.
- Guilbert L. (2005) *Étude du comportement et physiologie de la reproduction chez la fourmi Cardiocondyla elegans*. Université François Rabelais, Tours. Master I de Biologie des Populations. pp.19.
- Hamilton W.D. (1964) The genetical evolution of social behaviour. *Journal of Theoretical Biology*, 7, part I 1-16; part II 17-52.
- Hamilton W.D. (1979) Wingless and fighting males in fig wasps and other insects. In: *Sexual selection and reproductive competition in insects* (eds. Blum MS & Blum NA), pp. 167-220. New-York: Academic, New-York
- Heinze J. (1997) Male reproductive strategies in ants. *Proceedings of the International Colloquia on Social Insects, Russian Language Section of the IUSSI, Socium, St. Petersburg.*, 3-4, 179-187.
- Heinze J., Cremer S., Eckl N. & Schrempf A. (2006) Stealthy invaders: the biology of *Cardiocondyla* tramp ants. *Insectes Sociaux*, 53, 1-7.
- Heinze J. & Hölldobler B. (1993) Fighting for a harem of queen: Physiology of reproduction in *Cardiocondyla* male ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 8412-8414.
- Heinze J., Hölldobler B. & Yamauchi K. (1998) Male competition in *Cardiocondyla* ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42, 239-246.
- Heinze J., Kühnholz S., Schilder K. & Hölldobler B. (1993) Behavior of ergatoid males in the ant, *Cardiocondyla nuda*. *Insectes Sociaux*, 40, 273-282.
- Heinze J., Trindl A., Seifert B. & Yamauchi K. (2005) Evolution of male morphology in the ant genus *Cardiocondyla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 278-288.

- Hoover S.E.R., Keeling C.I., Winston M.L. & Slessor K.N. (2003) The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften*, 90, 477-480.
- Hopper K.R. (1999) Risk-spreading and bet-hedging in insect population biology. *Annual Review of Entomology*, 44, 535-560.
- Katzav-Gozansky T., Soroker V., Ibarra F., Francke W. & Hefetz A. (2001) Dufour's gland secretion of the queen honeybee (*Apis mellifera*): an egg discriminator pheromone or a queen signal? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51, 76-86.
- Keller L. & Passera L. (1992) Mating system, optimal number of matings, and sperm transfer in the Argentine ant *Iridomyrmex humilis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 31, 359-366.
- Keller L. & Passera L. (1993) Incest avoidance, fluctuating asymmetry, and the consequences of inbreeding in *Iridomyrmex humilis*, an ant with multiple queen colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 33, 191-199.
- King J.R., Andersen A.N. & Cutter A.D. (1998) Ants as bioindicators of habitat disturbance: validation of the functional group model for Australia's humid tropics. *Biodiversity and Conservation*, 7, 1627-1638.
- Kinomura K. & Yamauchi K. (1987) Fighting and mating behavior of dimorphic male in the ant *Cardiocondyla wroughtoni*. *Journal of Ethology*, 5, 75-81.
- Lafréchoux C., Mercier J.-L. & Lenoir A. (1999) Etude myrmécologique en Touraine. *Recherches naturalistes en Région Centre*, 2, 17-23.
- Majer J.D. (1983) Ants: bio-indicators of minesite rehabilitation, land-use, and land conservation. *Engineering Management* 7, 375-385.
- Majer J.D. (1985) Recolonization by ants of rehabilitated mineral sand mines on North Stradbroke Island, Queensland, with particular reference to seed removal. *Australian Journal of Ecology*, 10, 31-48.
- Majer J.D., Day J.E., Kabay E.D. & Perriman W.S. (1984) Recolonization by ants in bauxite mines rehabilitated by a number of different methods. *Journal of Applied Ecology*, 21, 355-375.
- Martin S.J., Jones G.R., Châline N., Middleton H. & Ratnieks F.L.W. (2002) Reassessing the role of the honeybee (*Apis mellifera*) Dufour's gland in egg marking. *Naturwissenschaften*, 89, 528-532.
- Martin S.J., Jones G.R., Châline N. & Ratnieks F.L.W. (2004) Role of hydrocarbons in egg recognition in the honeybee. *Physiological Entomology*, 29, 395-399.

- Monnin T. & Peeters C. (1998) Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *Animal Behaviour*, 55, 299-306.
- Morse R.A., Strang G.E. & Nowakowski J. (1967) Fall death rates of drone honey bee. *Journal of Economic Entomology*, 60, 1198-1202.
- Neumann F.G. (1992) Responses of foraging ant populations to high intensity wildfire, salvage logging and natural regeneration processes in *Eucalyptus regnans* regrowth forest of the Victorian central highlands. *Australian Forestry*, 55, 29-38.
- Page R.E. & Peng C.Y.-S. (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36, 695-711.
- Pardi L. (1942) Ricerche sui Polistini. 5. Poliginia iniziale di *Polistes gallicus* L. *Boll. Istit. Entomol. Univ. Bologna*, 14, 1-106.
- Passera L. & Aron S. (2005) *Les fourmis : comportement, organisation sociale et évolution*. Les Presses scientifiques du CNRC, Ottawa, Canada. pp.480.
- Passera L. & Keller L. (1994) Mate availability and male dispersal in the Argentine ant *Linepithema humile* (Mayr). *Animal Behaviour*, 48, 361-369.
- Pearcy M. (2005) *Stratégies reproductrices chez la fourmi Cataglyphis cursor*. Université Libre de Bruxelles, Bruxelles. Doctorat pp.108.
- Pearcy M., Aron S., Doums C. & Keller L. (2004) Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science*, 306, 1780-1783.
- Pearcy M., Hardy O. & Aron S. (2006) Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity*, Advance Online Publication, 1-6.
- Peeters C., Billen J. & Hölldobler B. (1992) Alternative dominance mechanisms regulating monogyny in the queenless ant genus *Diacamma*. *Naturwissenschaften*, 79
- Peeters C. & Higashi S. (1989) Reproductive dominance controlled by mutilation in the queenless ant *Diacamma australe*. *Naturwissenschaften*, 76, 177-180.
- Péru L. (1999) Quelques ajouts et corrections à un catalogue des fourmis de la Région Centre (Hymenoptera, Formicidae). *Bulletin de l'Entomologie Tourangelle*, 20, 9-12.
- Pfennig D.W. (1995) Absence of joint nesting advantage in desert seed harvester ants: evidence from a field experiment. *Animal Behaviour*, 49, 567-575.
- Rodrigues S., Bréhéret J.G., Macaire J.J., Moatar F., Nistoran D. & Jugé P. (2006) Flow and sediment dynamics in the vegetated secondary channels of an anabranching river: the Loire River (France). *Sedimentary Geology*, 186, 89-109.

- Ross K.G. (1990) Breeding systems and kin selection in social Hymenoptera. In: *Social insects and the environment* (eds. Veeresh GK, Mallik B & Viraktamath CA), pp. 347-348. Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi
- Ryti R.T. & Case T.J. (1992) The role of neighborhood competition in the spacing and diversity of ant communities. *American Naturalist*, 139, 355-374.
- Schrempf A., Reber C., Tinaut A. & Heinze J. (2005) Inbreeding and local mate competition in the ant *Cardiocondyla batesii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57, 502-510.
- Seifert B. (2003) The genus *Cardiocondyla* (Insects: Hymenoptera: Formicidae) - a taxonomic revision of the *C. elegans*, *C. bulgarica*, *C. batesii*, *C. shuckardi*, *C. stambuloffii*, *C. wroughtonii*, *C. emeryi*, and *C. minutior* species groups. *Ann. Naturhist. Mus. Wien*, 104B, 203-338.
- Slessor K.N., Foster L.J. & Winston M.L. (1998) Royal flavors : honey bee queen pheromones. In: *Pheromone communication in social insects* (eds. Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML & Espelie KE), pp. 331-343. Westview Press
- Stuart R.J., Francoeur A. & Loiselle R. (1987) Lethal fighting among dimorphic males of the ant, *Cardiocondyla wroughtonii*. *Naturwissenschaften*, 74, 548-549.
- Tindo M., Turillazzi S. & Dejean A. (1997) Behavioral caste differentiation in the primitively eusocial wasp *Belonogaster juncea juncea* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of Insect Behavior*, 10, 571-580.
- Trivers R.L. (1974) Parent-offspring conflict. *American Zoologist*, 14, 249-264.
- Trivers R.L. & Hare H. (1976) Haplodiploidy and the evolution the social insects. *Science*, 191, 249-263.
- Van der Blom J. (1986) Reproductive dominance within the colonies of *Bombus terrestris* (L.). *Behaviour*, 97, 37-49.
- Van Doorn A. & Heringa J. (1986) The ontogeny of a dominance hierarchy in colonies of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux*, 33, 3-25.
- Van Honk C.G.J., Röseler P.-F., Velthuis H.H.W. & Hoogeveen J.C. (1981) Factors influencing the egg-laying of workers in a captive *Bombus terrestris* colony. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 9, 9-14.
- Vanderwoude C., Andersen A.N. & House A.P.N. (1997) Community organisation, biogeography, and seasonality of ants in an open forest of south-eastern Queensland. *Australian Journal of Zoology*, 45, 523-537.
- Warburg I. & Steinberger Y. (1997) On the spacial distribution of nests of the ants *Messor arenarius* and *Messor ebeninus*. *Journal of Arid Environments*, 36, 671-676.

- Wenseleers T., Tofilski A. & Ratnieks F.L.W. (2005) Queen and worker policing in the tree wasp *Dolichovespula sylvestris*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58, 80-86.
- West-Eberhard M.J. (2003) *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press, Oxford. pp.794.
- Yamauchi K. & Kawase N. (1992) Pheromonal manipulation of workers by a fighting male to kill his rival males in the ant *Cardiocondyla wroughtonii*. *Naturwissenschaften (Historical Archive)*, 79, 274-276.
- Yamauchi K., Kimura Y., Corbara B., Kinomura K. & Tsuji K. (1996) Dimorphic ergatoid males and their reproductive behavior in the ponerine ant *Hypoconera bondroiti*. *Insectes Sociaux*, 43, 119-130.
- Yamauchi K. & Kinomura K. (1993) Lethal fighting and reproductive strategies of dimorphic males in *Cardiocondyla* ants (Hymenoptera: Formicidae). In: *Evolution of insect societies* (eds. Inoue T & Yamane S), pp. 373-402, Hakuhinsha, Tokyo
- Yamauchi K., Oguchi S., Nakamura Y., Suetake H., Kawada N. & Kinomura K. (2001) Mating behavior of dimorphic reproductives of the ponerine ant, *Hypoconera nubatama*. *Insectes Sociaux*, 48, 83-87.
- York A. (1994) The long-term effects of fire on forest ant communities: management implications for the conservation of biodiversity. *Memoirs of the Queensland Museum*, 36, 231-239.

Structure sociale et stratégie de reproduction chez *Cardiocondyla elegans*

Résumé

Cardiocondyla elegans est une fourmi méditerranéenne que l'on retrouve sur les bords de Loire. Cette espèce possède quelques particularités, comme par exemple avoir des mâles aptères. L'objectif de cette thèse était de comprendre sa biologie, ses stratégies de reproduction ainsi que les caractéristiques de son environnement. Pour cela, nous avons utilisé une **approche multidisciplinaire**, menant des études de pédologie, d'écologie et de botanique (caractérisation de l'habitat et de l'environnement), ainsi que de génétique et d'éthologie (structure génétique des nids et des populations, détermination du génotype et comportement des sexués).

Après avoir confirmé génétiquement la **monogynie** de cette espèce (une seule reine entourée d'environ 200 ouvrières), nous nous sommes attachés à analyser l'habitat de *C. elegans*. Le nid est creusé dans le sol jusqu'à 40 cm de profondeur. Il est composé, comme celui de nombreuses autres espèces, d'un conduit vertical reliant une dizaine de chambres superposées. En milieu ligérien, *C. elegans* est retrouvée uniquement sur les grèves en fixation. Nous avons montré que la **composition des sédiments de ces grèves était importante pour la survie de cette fourmi**. Durant l'été, elle permet dans les chambres les plus profondes, de conserver une température constante inférieure à 30°C avec de très faibles variations quotidiennes. Durant les crues, les sédiments composés de moins de 60% de sable, ne sont que très peu entraînés par le courant (grèves « fixées »). De plus ils permettent, lors de la remontée de la nappe alluviale, la création de poches d'air nécessaires à la survie des fourmis.

L'étude de la répartition spatiale des nids au cours des années nous a révélé que **40% des nids disparaissent d'une année sur l'autre suite aux conditions hivernales**. Cependant, suffisamment d'individus sexués, en l'occurrence des femelles fécondées, survivent pour fonder de nouveaux nids. La population étudiée de *C. elegans* sur les bords de Loire montre une forte densité avoisinant 1 nid/m². Les grèves fixées étant des environnements morcelés, les nids entrent en **compétition pour l'espace** et se distribuent de façon régulière. Ainsi, moins de 1% des femelles réussissent à fonder de nouveaux nids.

De Juillet à Septembre, les nids matures produisent des individus sexués. Alors que les femelles sont ailées, *C. elegans* possède une particularité par rapport aux autres fourmis : elle ne produit que des **mâles ergatoïdes** (sans ailes) tolérants entre eux. Nous avons déterminé que lors de la période de reproduction, les nids contenaient en moyenne 5,3 mâles ergatoïdes et 76,6 femelles ailées. La reine est généralement fécondée par plusieurs mâles. Ainsi les individus du nid sont issus de la même mère mais peuvent avoir des pères différents (en moyenne 4,5 **fratries** par nid).

En analysant la structure génétique des populations nous pouvons dire que 30% des accouplements impliquent des individus non apparentés. Ce fait est dû à la présence de nombreux **sexués étrangers** à l'intérieur des nids. La présence d'individus étrangers dans des colonies monogynes est singulière et nous a amené à nous interroger sur les stratégies de reproduction de *C. elegans*. Des tests comportementaux nous ont permis de mettre en évidence que les mâles étaient toujours acceptés lorsqu'ils tentaient de pénétrer dans une nouvelle colonie contrairement aux femelles ailées qui sont systématiquement attaquées. La présence de femelles ailées dans des nids étrangers s'explique par leur **transport par des ouvrières**, un comportement que nous avons observé sur le terrain en période de reproduction. Ces échanges de sexués pourraient permettre de diminuer la consanguinité à l'intérieur de la population, évitant ainsi la production de mâles diploïdes (stériles) et procurer une meilleure résistance de la population en cas de changements environnementaux.

L'étude de cette fourmi nous a permis de mettre en évidence une **stratégie de reproduction originale**, décrite ici pour la première fois. Notre étude révèle également que *C. elegans* est la seule espèce de fourmis à être adaptée aux conditions environnementales des grèves en fixation. La seule présence de cet organisme, au même titre que certaines espèces végétales, permet de **caractériser une étape de l'évolution morphologique des chenaux secondaires de la Loire**.

Social structure and reproductive strategies of *Cardiocondyla elegans*

Summary

Cardiocondyla elegans is a Mediterranean ant that is present in the Loire River sides. The aims of this thesis were to have a better understanding of its biology, reproductive strategies as well as the characteristics of its environment. We then used an **integrated framework**: pedology, ecology and botanic for the habitat and environment characterization, genetic and ethology to determine the genetic structure of nests and populations and to investigate behaviour of sexual individuals.

C. elegans nests consist of a 40 cm deep vertical pipe connecting a dozen of chambers. In Loire River habitats, *C. elegans* was found only in stable alluvial deposits. **The composition of these sediments are from importance for the survival of the nests**. They provide constant temperature in the deepest chambers; even in the hottest period of the summer, temperature remains less than 30°C with few daily variations. As the sediments containing less than 60% fine sand, the habitat can resist to floods and these rises in the watertable can retain an air pocket needed for ants to survive.

Our study on spatial distribution of colonies along two successive years reveals that **40% of them disappear because of the winter conditions**. Nonetheless, numerous winged females survive and found new nests. *C. elegans* generally attains a density of 1 nest per m² in Loire riverine habitat during the summer. As this ant lives in a patchy environment, **colonies compete for space**, and we found that they finally distribute regularly. Intra-specific competition is probably one of the reasons why less than 1% of the new queen success in nest foundation.

From July to September, mature nests produce sexual individuals. *C. elegans* develop regular winged female and more peculiar wingless ergatoid males. Contrary to other ergatoid males in *Cardiocondyla* genus, males of *C. elegans* are mutually tolerant. We confirmed **monogyny** for this species with one queen and about 200 workers per nest. The mean numbers of ergatoid males and winged females during the reproductive period are respectively 5.3 and 76.6. Usually, the mother queen was mated by several males. Individuals of the same nest came from about 4.5 different **patriline**s. Analysis of the population genetic structure indicates that 30% of the copulations involve unrelated partners. We also founded numerous **alien sexuals** inside the nests. Foreign sexuals inside nests of a monogynous ant species is puzzling and ask questions on the reproductive strategies of *C. elegans*. In behavioural tests of adoption, host workers always accept ergatoid males to enter their nest whereas they repel and attack winged females. The presence of alien winged females inside nests can be explained by the active carrying behaviour of some workers in the field. These **workers carry winged females** from a nest to another one and host workers do not develop aggressive behaviour in these conditions. Exchanges of sexual individuals can reduce inbreeding depression in the population and then avoid diploid males' problems. That also provides more genetic variability to resist in case of major environmental changes.

Then, our study show an **original reproductive strategy** for *C. elegans*, describes here for the first time. We also show that *C. elegans* is the only ant species adapted to early stages of stabilization of the alluvial deposits. Thus, along with the local flora, *C. elegans* can be used as an indicator to **characterize the morphological evolution of the secondary channels of the Loire River**.