

UNIVERSITE PARIS 13

Ecole Doctorale de Galilée

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Ethologie

Laboratoire d'Ethologie Expérimentale et Comparée

Présentée par

Margot PEREZ

Division du travail, apprentissage et perception des odeurs chez la fourmi
Camponotus aethiops

Soutenue le 8 janvier 2015 devant le jury composé de :

Pr Dominique Fresneau , Université Paris 13	Président
Dr Jean-Christophe Sandoz , CNRS (Gif-sur-Yvette)	Rapporteur
Dr Roxana Josens , Université de Buenos Aires	Rapporteur
Dr Gérard Coureaud , CNRS (Université de Bourgogne)	Examineur
Pr Patrizia d'Ettorre , Université Paris 13	Directeur de thèse
Pr Martin Giurfa , Université Paul Sabatier (Toulouse)	Directeur de thèse

UNIVERSITE PARIS 13

Ecole Doctorale de Galilée

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Ethologie

Laboratoire d'Ethologie Expérimentale et Comparée

Présentée par

Margot PEREZ

Division du travail, apprentissage et perception des odeurs chez la fourmi
Camponotus aethiops

Soutenue le 8 janvier 2015 devant le jury composé de :

Pr Dominique Fresneau , Université Paris 13	Président
Dr Jean-Christophe Sandoz , CNRS (Gif-sur-Yvette)	Rapporteur
Dr Roxana Josens , Université de Buenos Aires	Rapporteur
Dr Gérard Coureaud , CNRS (Université de Bourgogne)	Examineur
Pr Patrizia d'Ettorre , Université Paris 13	Directeur de thèse
Pr Martin Giurfa , Université Paul Sabatier (Toulouse)	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie en premier lieu Dominique Fresneau, Jean-Christophe Sandoz, Roxana Josens et Gérard Coureaud d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également mes directeurs de thèse Patrizia d'Ettorre et Martin Giurfa, de m'avoir encouragée à faire cette thèse et pour la confiance qu'ils m'ont témoignée depuis ces 5 dernières années. Martin, merci de m'avoir acceptée dans votre équipe dès le M1 malgré mon background plutôt mathématiques/statistiques. Patrizia, merci pour ta disponibilité et pour ton aide jusque dans les derniers préparatifs de la thèse.

Merci à l'ensemble des membres du LEEC pour leur gentillesse, leur aide et tous les moments Sodexo durant ces trois dernières années: Dominique, Heiko, Steph, Nico, Gilles, Renée, Fabrice, Christophe, Chantal, David, Elise et Patrick.

Un grand merci à Monique, Isabelle, Catherine et Alain pour votre aide technique et administrative et pour nos agréables échanges.

Merci à Paul McGiver pour le montage des fourmis présenté dans cette thèse, tes idées de génie et pour toutes les chansons pourries que tu me mets dans la tête.

Merci à Chloé pour son aide avec la chimie.

Remerciements particuliers à tous mes dear friends and colleagues qui m'ont apporté tant de choses d'un point de vue professionnel et personnel... Merci à Lisa pour toutes nos discussions sur la terrasse et pour ta joie de vivre qui égaie le labo; Merci à Pouffi pour tout ce que tu es dans le verbe et dans le geste ; Merci à l'Estonien pour nos discussions de vieilles pies ; Merci à Blachouille et Marjo pour leur tendresse envers tous les Dominguez-Lopez-Rodriguez-Gimenez-Fernandez.

Merci aux thésards et aux stagiaires que j'ai pu croiser au 6^{ème} : Olivier, Manu, Mathilde, Rémi, Lara, Laurie, Pauline, Eve et Uther.

Cette thèse ce n'était pas que des manips et de la recherche, c'était aussi l'aventure du monitorat ! Merci à Gilles pour ton aide dans la gestion des UE, j'espère t'avoir transmis tout mon savoir. Merci aux autres acolytes NSC et CPO, particulièrement Dominique (j'attends toujours notre verre pour fêter la fin de CPO...) ! Merci au Blond, Houpette, Momo et tous les étudiants de Licence en règle générale, mon monitorat n'aurait pas été le même sans vous...

Quels mots puis-je trouver pour exprimer ma gratitude envers Pym et Chouchou pour leur aide incommensurable dans la réalisation de cette thèse. Je ne sais pas comment j'aurais fait sans vous, sincèrement, merci.

Merci à tous mes amis de Bordeaux et de Toulouse. Merci à toi Elise, ma peu***, tu es toujours là quand j'en ai besoin, on se comprend... Merci à Mel et Crapaud pour m'avoir accueillie à chaque fois que je descendais sur Toulouse mais aussi d'être de si bons amis et depuis si longtemps. Merci à Pym, Mehdi et Pierrot d'avoir toujours là pour me remonter les bretelles, et c'était nécessaire. Merci à toi aussi Le Roux, même si tu n'as pas d'âme (quand tu veux pour le concert de Laurent Voulzy). Merci à tous les Ritaux parisiens (Federico, Michele, il Capitano, Stella, Anush, Elisa...) pour le soleil que vous amenez et pour toutes les bonnes soirées passées à vos côtés. Merci aux autres parisiens Caro, Hélène, Emna,...

Merci à mes colocs parisiens qui sont passés ou restés : Pia, Guillermo, Pym, Davoud, Yvain et le canal de l'Ourq pour les moments, apéro et pétanques partagés.

Un merci tout particulier à Chouchou. Tu me portes la poisse, tu ne sais pas monter un meuble... mais tu maîtrises le petit dej' et la trichouille comme personne. Merci de m'avoir acceptée malgré ma jambe plus courte et pour ton soutien.

Je remercie grandement toute ma famille et particulièrement mes parents, ma sœur, Paul et le Bibou. Je mesure la chance que j'ai de vous avoir dans ma vie et les mots me manquent pour exprimer combien je vous aime et vous remercier pour l'aide, le soutien et l'amour que vous m'apportez depuis toujours.

Enfin, merci aux fourmis qui se sont toujours montrées coopératives lors des expériences, rein n'aurait été possible sans vous.

A mes parents,

A ma sœur

Table des matières

Index des figures	13
Liste des abréviations	14
Définitions.....	15
 Introduction générale	 19
I) Apprentissage et perception des odeurs	20
1) L'apprentissage associatif	20
2) La perception des odeurs	22
a) De la molécule d'odeur à la perception	22
b) La perception des mélanges d'odeurs	25
c) L'expérience olfactive.....	27
 II) La fourmi : un modèle pertinent pour l'étude de l'apprentissage et de la perception des odeurs	 29
1) La fourmi, un insecte eusocial	30
2) Apprentissage et mémoire olfactifs chez la fourmi.....	36
a) Conditionnement pavlovien olfactif appétitif de la réponse d'extension du <i>maxilla-labium</i>	37
b) Des capacités d'apprentissage variables mais remarquables	39
3) La perception des odeurs	41
a) Le système olfactif de la fourmi	41
b) La représentation des odeurs dans le système nerveux	47
c) Approche comportementale de l'étude de la perception des odeurs.....	51
i. Perception des odeurs simples	52
ii. Perception des mélanges d'odeurs	53

Objectifs.....	55
Modèle d'étude : la fourmi <i>Camponotus aethiops</i>	59
Synthèse des résultats principaux	61
 Chapitre I	 65
Sucrose responsiveness, learning success and task specialization in ants	
 Chapitre II	 89
Olfactory similarity relationships change with the conditioning procedure in ants	
 Chapitre III	 127
The scent of mixtures: rules of odour processing in ants	
 Discussion générale.....	 173
I) La division du travail.....	173
1) Illustration du modèle des seuils de réponse chez la fourmi <i>Camponotus aethiops</i> .	173
2) Hypothèses sur la variation des seuils de réponse avec l'âge	177
II) L'apprentissage associatif olfactif appétitif	184
1) La sensibilité au stimulus inconditionnel	184
2) La caste comportementale	185
3) La procédure et les paramètres du conditionnement	187
III) La perception des odeurs.....	189
1) La structure chimique des odeurs : un facteur déterminant dans la perception des odeurs simples et des mélanges d'odeurs binaires	189
a) La similarité perceptuelle	190
b) La perception des mélanges d'odeurs binaires	191

2) Effet de la procédure et des paramètres du conditionnement sur la similarité perceptuelle	193
a) La procédure de conditionnement	193
b) Les paramètres du conditionnement : un effet de l'IIE ?	195
3) Hypothèses sur les mécanismes neurophysiologiques supportant les réponses comportementales obtenues.....	196
Conclusion	203
Annexes I	207
Annexes II	209
Références	217

Index des figures

Figure 1 : Le conditionnement pavlovien.	21
Figure 2 : Parallèle entre le système olfactif des insectes et des vertébrés.	23
Figure 3 : les molécules odorantes diffèrent dans de nombreuses dimensions chimiques.	25
Figure 4 : Illustration des principales théories proposées pour rendre compte de la perception et de l'apprentissage des mélanges d'odeurs.....	26
Figure 5 : Polymorphisme chez la fourmi <i>Camponotus aethiops</i>	31
Figure 6 : Schéma de l'allocation des tâches au cours de la vie d'une fourmi ouvrière.	32
Figure 7 : Réponse d'extension du <i>maxilla-labium</i> (REMaL) de la fourmi et réflexe d'extension du proboscis (REP) de l'abeille.	37
Figure 8 : Conditionnement pavlovien de la réponse d'extension du <i>maxilla-labium</i> (REMaL).	38
Figure 9 : Performances d'apprentissage et de rétention lors du conditionnement olfactif appétitif de la REMaL.....	40
Figure 10 : Schéma du système olfactif de la fourmi.	42
Figure 11 : Schéma du traitement de l'information olfactive chez la fourmi.	45
Figure 12 : Représentation des odeurs dans le lobe antennaire chez la fourmi <i>Camponotus fellah</i>	48
Figure 13 : Variabilité interindividuelle des seuils de réponse au sucre chez la fourmi <i>Camponotus aethiops</i>	175
Figure 14 : Hypothèses pouvant expliquer la variabilité interindividuelle des seuils de réponse au sucre chez les ouvrières.....	183
Figure 15 : Hypothèses neurophysiologiques relatives à la généralisation et à l' <i>overshadowing</i>	197

Liste des abréviations

5-HT : sérotonine

ab : anneau basal des corps pédonculés

BO : bulbe olfactif

Ca : calyx

CC : complexe central

CG : cellule granulaire

CL : corne latérale

CP : corps pédonculés

CPG : cellule périglomérulaire

DA : dopamine

IIE : intervalle inter-essai

I : lèvres des corps pédonculés

LA : lobe antennaire

LO : lobe optique

M : cellule mitrale

NAC : nombre d'atomes de carbone

NL : interneurone local

NP : neurone de projection

NRO : neurone récepteur olfactif

OA : octopamine

P : cellule à panache

RC : réponse conditionnée

REMaL : réponse d'extension du *maxilla-labium*

REP : réflex d'extension du proboscis

RI : réponse inconditionnelle

RO : récepteur olfactif

SC : stimulus conditionnel

SC+ : stimulus conditionnel positivement renforcé

SC- : stimulus conditionnel non renforcé/négativement renforcé

SI : stimulus inconditionnel

TAC-I : tractus antenno-cérébral latéral

TAC-m : tractus antenno-cérébral médian

TAC-ml : tractus antenno-cérébral médio-latéral

Définitions

Définitions de termes spécifiquement employés dans cette thèse :

Odeur sociale : toute odeur impliquée dans la communication chimique chez les fourmis telle que les phéromones (phéromones sexuelles, phéromone d'alarme, de piste, etc) ou les hydrocarbures présents sur la cuticule et qui sont impliquées dans la reconnaissance coloniale.

Odeur générale : par opposition à tout ce qui n'est pas une odeur sociale (par exemple, les odeurs florales).

Odeur simple : odeur composée d'une seule molécule odorante (par opposition à un mélange d'odeurs).

Introduction générale

Introduction générale

Pour survivre et se reproduire, les animaux doivent faire face à un monde complexe et constamment variable. L'expression d'une réponse comportementale adaptée suppose que l'animal soit capable de percevoir et d'extraire les stimuli pertinents de son milieu et donc qu'il possède des systèmes perceptivo-cognitifs efficaces, capables de traiter ces stimuli. Certaines réponses comportementales semblent être exprimées de manière relativement stéréotypée (e.g., le comportement de fuite en présence de l'odeur d'un prédateur), d'autres, plus flexibles, reposent sur leur association avec des conséquences, positives ou négatives faisant suite à la présentation des stimuli (e.g., l'association de l'odeur d'une fleur avec la source de nectar qu'elle fournit, pour une abeille). Ainsi, l'apprentissage ou l'expérience individuelle peuvent revêtir un rôle déterminant pour la survie de l'animal.

Les molécules odorantes volatiles émises entre autres par les plantes, la nourriture, ou les animaux, constituent une source d'informations considérable de l'environnement. C'est probablement pour cette raison que l'olfaction est la modalité sensorielle la plus partagée dans le monde animal (Wyatt, 2014) et que la majorité des animaux, aussi bien les vertébrés que les invertébrés, montrent des capacités d'apprentissage olfactif remarquables (Davis, 2004). Un des enjeux majeurs des recherches en neurosciences est ainsi de comprendre comment les animaux perçoivent et apprennent les odeurs de l'environnement. En dépit des avancées considérables dans ce domaine depuis ces trente dernières années, de nombreuses questions restent encore non élucidées. Les études développées dans ce travail de thèse avaient pour objectif de contribuer à ce domaine et d'élargir nos connaissances sur la perception et l'apprentissage des odeurs chez la fourmi, un insecte social pour qui les odeurs occupent place prépondérante dans son comportement naturel aussi bien individuel que collectif.

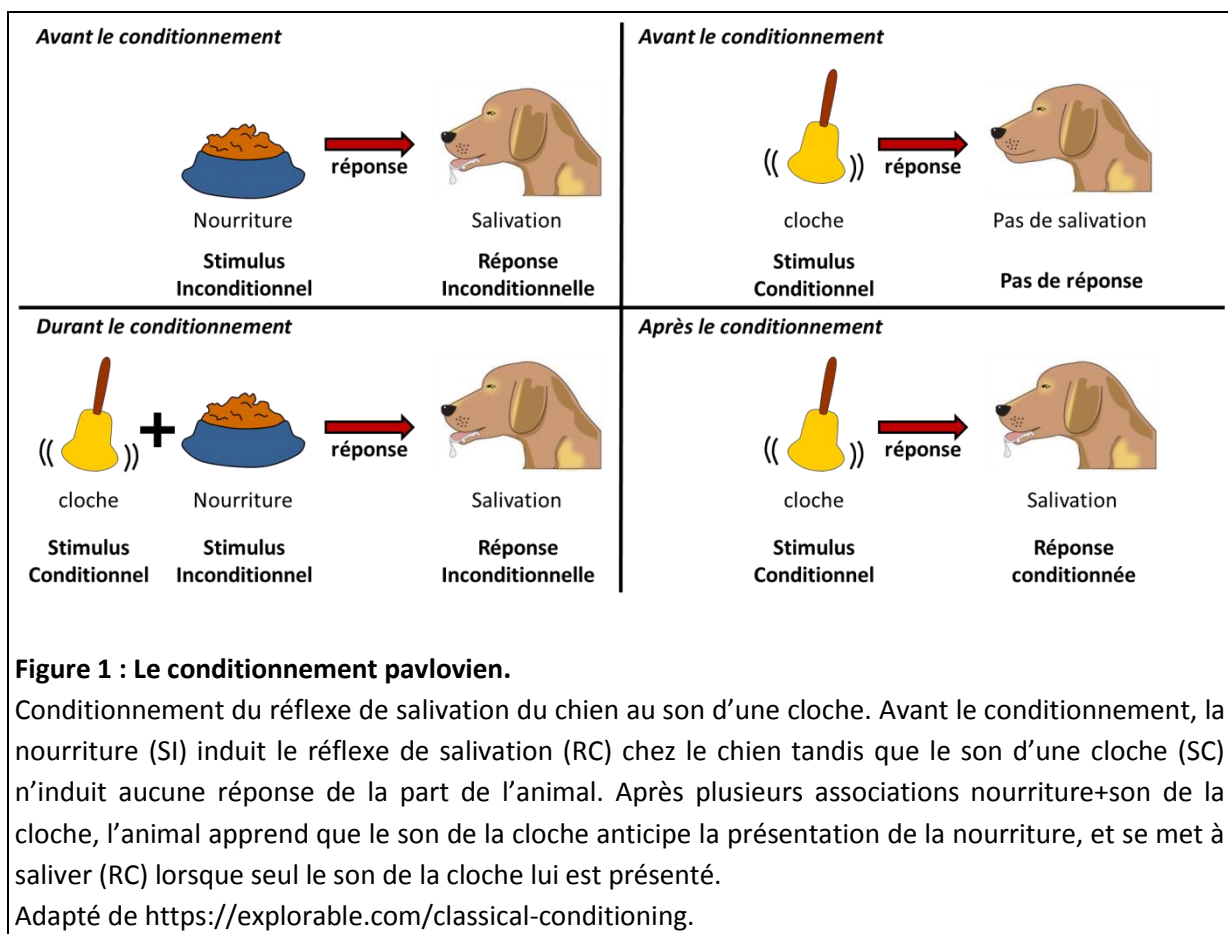
I) Apprentissage et perception des odeurs

1) L'apprentissage associatif

L'**apprentissage associatif** permet à un animal d'acquérir des informations sur son environnement à partir de son expérience individuelle. Il consiste en l'établissement de relations prédictives entre différents événements afin d'en réduire l'imprévisibilité et de produire des réponses adaptées face à des situations déjà rencontrées (Giurfa, 2007). L'apprentissage associatif est un phénomène largement répandu dans le règne animal que l'on retrouve aussi bien chez les vertébrés (e.g., souris : Watkins et al., 1998 ; rat : McAllister et al., 1972 ; lapin : Lockhart & Moore, 1975 ; chat : Norman et al., 1977 ; singes : Wolpaw, 1987 ; Homme : Daum et al., 1993) que chez les invertébrés (seiche : Cole & Adamo, 2005 ; aplysie : Brembs et al., 2002 ; abeilles : Bitterman et al., 1983 ; mouche : Quinn et al., 1974 ; grillon : Matsumoto & Mizunami, 2000 ; blatte : Sakura & Mizunami, 2001 ; fourmi : Dupuy et al., 2006; Guerrieri & d'Ettorre, 2010).

Le **conditionnement pavlovien** est certainement la forme d'apprentissage associatif le plus connu. Comme son qualificatif l'indique, il a été mis en évidence par Ivan Pavlov (1849-1936) qui avait observé que le réflexe de salivation chez un chien, déclenché par la présentation de nourriture, pouvait apparaître chez ce même animal lors des préparatifs qui précédaient l'exposition à la nourriture (Pavlov, 1927) (**Figure 1**). En effet, cette forme d'apprentissage consiste en l'association d'un stimulus originellement neutre (stimulus conditionnel, SC – le son d'une cloche par exemple), à un stimulus pertinent biologiquement pour l'animal (stimulus inconditionnel, SI – la présentation de nourriture par exemple), qui déclenche une réponse réflexe chez ce dernier (réponse inconditionnelle, RI – le réflexe de salivation chez le chien). La présentation appariée du SC au SI va conférer au SC une valeur prédictive du SI. En conséquence, l'animal ayant appris l'association des deux stimuli va répondre à la seule présentation du SC par une réponse conditionnée (RC), similaire à celle déclenchée par la présentation du SI. Dans ce cas, le tintement de la cloche (SC) déclenche le réflexe de salivation (RC) chez le chien en raison de la valeur prédictive de ce SC sur la présentation de la nourriture (SI).

D'autres formes d'apprentissage existent telles que le **conditionnement opérant** (ou instrumental) (Skinner, 1938). Dans ce cadre, c'est la relation entre le comportement propre de l'animal et les conséquences de ce comportement qui est établie. Par exemple, dans la boîte de Skinner (Skinner, 1938), un rat apprend qu'à chaque fois qu'il presse un levier, de la nourriture est délivrée dans la mangeoire. Au cours des essais, l'animal va ainsi augmenter la fréquence de pression du levier afin d'obtenir la récompense.



Parmi les formes d'apprentissage pavlovien, on distingue le **conditionnement absolu**, dans lequel un seul stimulus est présenté et renforcé (SC+), du **conditionnement différentiel**, au cours duquel deux stimuli sont présentés dont un stimulus est renforcé (SC+) alors que l'autre stimulus n'est pas renforcé (SC-) (Giurfa, 2007). Dans le cas du conditionnement différentiel, certaines variations peuvent être apportées comme par

exemple l'association d'un des deux stimuli (SC+) avec un renforcement positif et l'association de l'autre stimulus avec un renforcement négatif (SC-).

Les conditionnements absolu et différentiel résultent en des expériences différentes pour l'individu. En effet, lors d'un conditionnement différentiel, l'animal apprend non seulement le stimulus récompensé, générant ainsi un profil excitateur qui pourra guider les réponses vers des stimuli similaires au récompensé, mais aussi le stimulus non récompensé, générant ainsi un profil inhibiteur qui pourra guider les réponses vers des stimuli similaires au non récompensé.

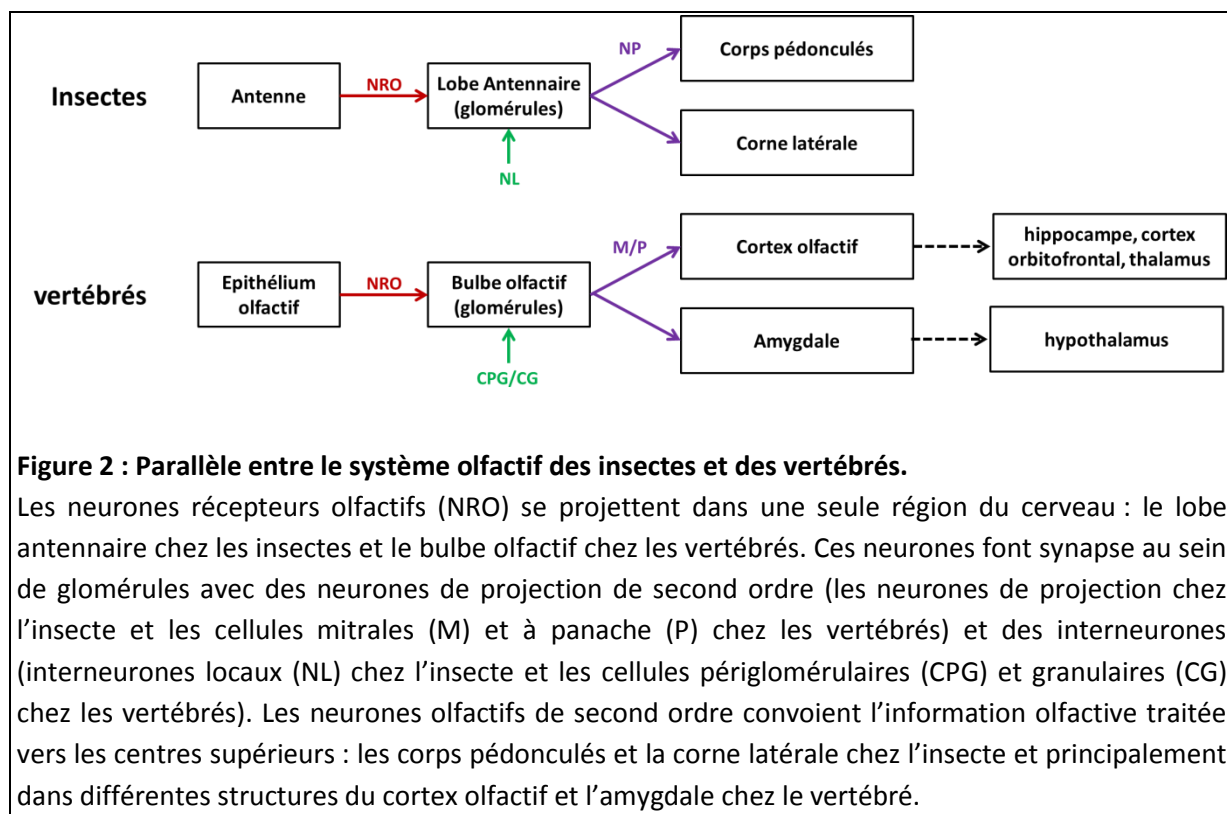
2) La perception des odeurs

a) De la molécule d'odeur à la perception

La majorité des animaux sont capables de détecter, différencier et apprendre les odeurs présentes dans l'environnement telles que celles émanant des sources de nourriture, des prédateurs ou des partenaires sexuels potentiels, leur permettant ainsi d'augmenter leurs chances de survie et de reproduction.

Les capacités olfactives des animaux sont sous-tendues par leur système olfactif. En dépit de la divergence évolutive survenue il y a plusieurs centaines de millions d'années entre les insectes et les vertébrés, et les nombreuses différences morphologiques, physiologiques ou comportementales entre ces classes d'animaux, leurs systèmes olfactifs partagent des similarités structurelles et fonctionnelles dans la manière dont les signaux olfactifs sont détectés et traités par leur système nerveux (Hildebrand & Shepherd, 1997; Ache & Young, 2005; Dupuy et al., 2010) (**Figure 2**). Ceci suggère que les mécanismes sous-tendant la perception, la discrimination et l'apprentissage olfactif sont similaires entre les insectes et les vertébrés. Les molécules odorantes sont détectées au niveau périphérique par les récepteurs olfactifs (RO) présents sur les antennes des insectes et dans l'épithélium olfactif des vertébrés. L'activation des récepteurs olfactifs est transduite en potentiels électriques dans les neurones récepteurs olfactifs (NRO) qui se projettent dans le premier relai du traitement de l'information olfactive: le lobe antennaire (LA) chez les insectes et le bulbe olfactif (BO) chez les vertébrés. Le LA et le BO sont tous deux formés de structures

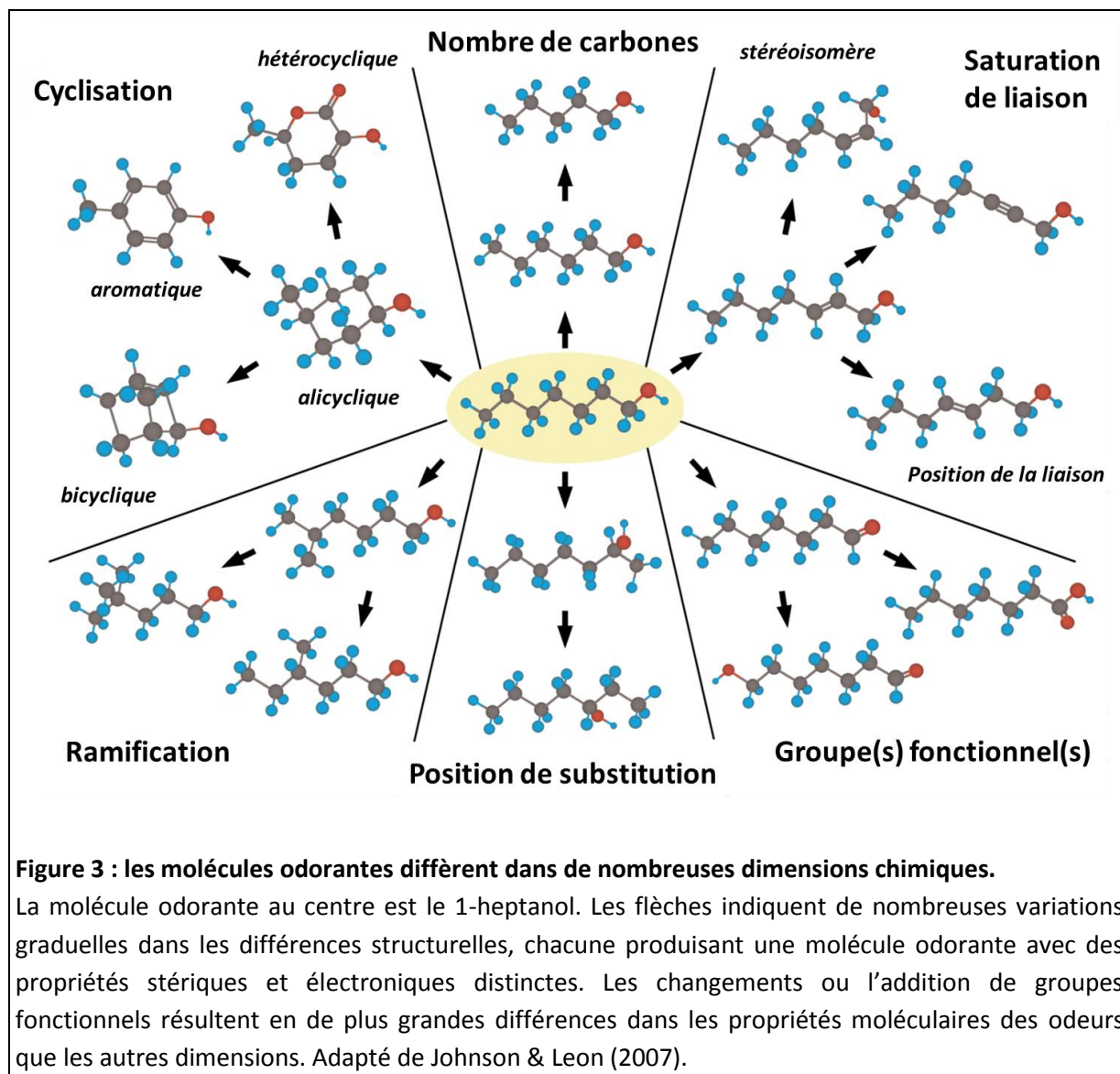
ovoïdes, appelées glomérules, qui sont interconnectées par l'intermédiaire d'interneurones : les interneurones locaux (NL) chez l'insecte et les cellules périglomérulaires (CPG) et granulaires (CG) chez les vertébrés. L'information olfactive est ensuite convoyée par les neurones de projection (NP) chez les insectes et les cellules mitrales (M)/à panache (P) chez les vertébrés, vers les centres supérieurs : les corps pédonculés et la corne latérale chez les insectes et principalement dans différentes structures du cortex olfactif et dans l'amygdale chez les vertébrés. Dans ces centres supérieurs, une représentation perceptuelle de l'odeur est ainsi générée, permettant à la fois d'adopter une réponse comportementale adaptée et d'apprendre la relation entre les signaux olfactifs et leurs conséquences.



L'un des enjeux des neurosciences sensorielles est de comprendre comment les animaux perçoivent leur environnement. Dans ce cadre, les recherches sur l'olfaction se sont intéressées aux règles gouvernant la perception des odeurs. Certains travaux ont ainsi été menés dans le but d'identifier les propriétés des molécules odorantes qui permettent à ces odeurs d'être perçues comme similaires ou dissimilaires. Cette notion réfère aux facultés des animaux à, respectivement, **généraliser** et **discriminer** les odeurs.

La généralisation consiste à exprimer une réponse équivalente face à des stimuli olfactifs différents mais similaires, tandis que la discrimination consiste à répondre de manière distincte à des stimuli olfactifs différents (Pavlov, 1927; Guttman & Kalish, 1956; Shepard, 1987; Ghirlanda & Enquist, 2003). La généralisation permet notamment de faire face à des stimuli variables (Ghirlanda & Enquist, 2003). Par exemple, la concentration et la composition des odeurs émises par une même fleur peuvent varier dans le temps et l'espace (Dudareva et al., 2004) sans pour autant signifier une différence dans la qualité de nectar qu'elle fournit. La généralisation, ou similarité perceptuelle, des odeurs monomoléculaires (que nous appellerons **odeurs simples** par la suite) dépendrait de la similarité structurelle des molécules odorantes aussi bien chez les vertébrés (Laska & Freyer, 1997; Laska & Teubner, 1998, 1999; Laska et al., 1999*b*; Linster & Hasselmo, 1999; Laska & Hübener, 2001; Cleland et al., 2002) que les invertébrés (Laska et al., 1999*a*; Daly et al., 2001; Guerrieri et al., 2005).

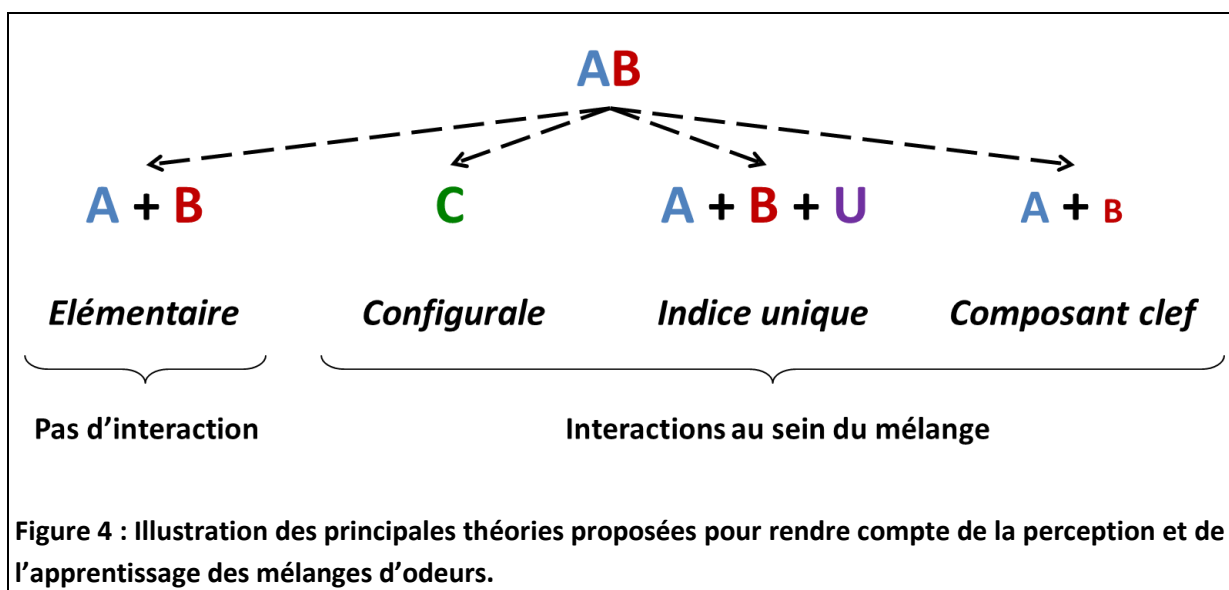
Cependant, les molécules odorantes varient dans de nombreuses **dimensions** telles que la longueur de la chaîne carbonée, le groupe fonctionnel ou la présence de cycles d'atomes (**Figure 3**), qui vont conférer aux molécules odorantes des propriétés stériques et électroniques différentes (Johnson & Leon, 2007; Haddad et al., 2008). Ainsi, contrairement à un ensemble de longueurs d'onde pour des stimuli visuels ou de fréquences sonores pour des stimuli auditifs, les odeurs ne peuvent être agencées de manière unidimensionnelle le long d'un continuum de descripteurs physiques et chimiques. Dès lors, il est bien souvent difficile de déterminer quelles sont les propriétés des odeurs donnant lieu à une généralisation, bien qu'il soit possible de sélectionner une série de molécules différant structurellement sur une seule dimension (on parle alors de série homologue) telle que la longueur de la chaîne carbonée (Haddad et al., 2008).



b) La perception des mélanges d'odeurs

Ces difficultés d'établir la contribution respective des différentes dimensions d'un même composé monomoléculaire dans les processus de perception olfactive trouvent un niveau de complexité supérieur lorsqu'on considère un mélange de composés monomoléculaires. En effet, la majorité des stimuli olfactifs présents dans la nature sont quasiment toujours des mélanges complexes de plusieurs molécules odorantes. De ce fait, de nombreuses recherches en neurosciences sensorielles et en psychologie expérimentale se sont intéressées aux mécanismes gouvernant la perception des stimuli olfactifs complexes.

Plusieurs théories ont été proposées pour rendre compte de la perception des mélanges de stimuli, indépendamment de la modalité sensorielle (**Figure 4**). La **théorie élémentaire** stipule que les mélanges seraient traités et appris de manière analytique, i.e. comme la simple somme des représentations individuelles des composants du mélange (Rescorla & Wagner, 1972). La **théorie configurale** propose que les mélanges seraient traités de manière synthétique, i.e. qu'il existe des interactions entre les composants d'un mélange, lui conférant ainsi des propriétés uniques permettant de le discriminer de ses composants (Pearce, 1987; Rudy & Sutherland, 1992). D'autres théories, reprenant les concepts de ces deux dernières, ont été proposées. La **théorie de l'indice unique** postule qu'au sein d'un mélange coexisteraient les représentations individuelles des composants ainsi qu'une représentation nouvelle, spécifique à ce mélange particulier (un « indice »), qui résulte de l'interaction des composants du mélange (Rescorla, 1972, 1973; Whitlow & Wagner, 1972). Des études sur la perception des mélanges d'odeurs chez l'abeille ont proposé l'**hypothèse des composants clefs** qui stipule qu'au sein d'un mélange complexe un individu percevrait et apprendrait certains composants plus que d'autres, bien que sa réponse aux composants clefs soit généralement inférieure à sa réponse au mélange, suggérant ainsi des interactions entre les composants du mélange (Pham-Delègue et al., 1993; Laloi et al., 2000; Reinhard et al., 2010).



Ainsi, à l'exception de la théorie purement élémentaire, les autres théories font état d'interactions au sein du mélange d'odeurs. Elles stipulent que ces interactions influencent de manière critique la perception et l'apprentissage d'un mélange. Un phénomène particulièrement pertinent dans l'étude des interactions au sein des mélanges d'odeurs est celui de l'**overshadowing** (Pavlov, 1927; Kamin, 1968, 1969). Pour étudier ce phénomène au sein d'un mélange binaire, par exemple, trois groupes d'animaux sont entraînés en parallèle : l'un est conditionné au mélange AB et les deux autres à chacun des deux composants du mélange (i.e. A et B). L'**overshadowing** se produit lorsqu'après avoir été entraînés au mélange AB, les individus répondent plus à l'un des deux composants (ils répondent par exemple plus à A qu'à B) (Rescorla & Wagner, 1972). Les groupes contrôles, i.e. ceux conditionnés à A ou à B, jouent ici un rôle critique dans l'interprétation de la réponse des animaux entraînés au mélange (Kamin, 1968, 1969). En effet, l'**overshadowing** est démontré si le niveau de réponse au composé B du groupe entraîné au mélange est strictement inférieur à celui de la réponse des individus entraînés à B uniquement. Ce phénomène a été rapporté aussi bien chez les vertébrés (Linster & Smith, 1997; Kay et al., 2005) que les invertébrés (Derby et al., 1996; Smith, 1996; Pelz et al., 1997; Smith, 1998) mais les raisons qui font qu'un composé apparaît plus saillant que l'autre demeurent encore inconnues. En effet, contrairement à la similarité perceptuelle, aucune règle prédictive basée sur les propriétés chimiques des composants d'un mélange n'est disponible pour rendre compte de l'occurrence du phénomène d'**overshadowing**.

c) L'expérience olfactive

Les travaux dans le domaine de l'olfaction ont montré que la discrimination comportementale d'odeurs similaires (odeurs simples ayant une structure chimique similaire ou mélanges complexes d'odeurs se différenciant dans leur composition par un ou quelques composants), pouvait être améliorée par l'expérience olfactive. En effet, une exposition passive à des odeurs ou un conditionnement différentiel permettent d'améliorer la discrimination et l'acuité olfactive (Rabin, 1988; Jehl et al., 1995; Daly et al., 2001; Cleland et al., 2002; Linster et al., 2002; Fletcher & Wilson, 2002; Wilson & Stevenson, 2003; Li et al., 2008; Mishra et al., 2010; Chen et al., 2011; Barth et al., 2014; Mandaïron & Linster, 2009). Dans le cadre du conditionnement différentiel, il est depuis longtemps proposé que

l'amélioration des performances de discrimination serait induite par l'interaction **de gradients d'excitation et d'inhibition** respectivement sous-tendus par le SC+ et le SC- (Spence, 1936; Hanson, 1959).

Les études sur la perception et l'apprentissage des odeurs ont été réalisées chez de nombreuses espèces animales. Afin de mieux comprendre les mécanismes et les phénomènes de perception et d'apprentissage, il s'est souvent avéré pertinent de se concentrer sur des modèles invertébrés plus simples. En effet, nous avons vu qu'il existait un parallèle remarquable entre les insectes et les vertébrés dans la manière dont sont organisés leurs systèmes olfactifs ainsi que dans les étapes qui conduisent au traitement des odeurs. Cependant, les insectes présentent l'avantage de posséder un système olfactif plus « simple » dans son organisation (moins de neurones) que celui des vertébrés et les considérations éthiques sont moins exigeantes, facilitant ainsi l'étude du fonctionnement de leur cerveau. En dépit de la relative simplicité de leur système olfactif et de leur cerveau en général, les insectes font malgré tout preuve de remarquables capacités de discrimination et d'apprentissage olfactifs, en raison certainement de la valeur critique des informations de nature olfactive dans la majorité de leurs comportements. Parmi les insectes, l'abeille (*Apis mellifera*) et la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*), ont été particulièrement étudiées dans le cadre de la perception et de l'apprentissage des odeurs (pour revues, Giurfa & Sandoz, 2012; Müller, 2012; Menzel, 2012 ; Jefferis et al., 2007; Davis, 2011; Kahsai & Zars, 2011). Pourtant, d'autres insectes telle que la **fourmi**, peuvent s'avérer des modèles pertinents et offrir un regard singulier et complémentaire dans l'étude de la perception et l'apprentissage des odeurs, comme nous allons le voir à présent.

II) La fourmi : un modèle pertinent pour l'étude de l'apprentissage et de la perception des odeurs

Du fait de leur succès écologique et de leur style de vie remarquables, les fourmis font depuis très longtemps l'objet de nombreuses recherches. En effet, les fourmis forment un groupe varié (on compte aujourd'hui près de 13000 espèces ; Agosti & Johnson, 2005) avec une très grande diversité de cycles biologiques. Présentes dans toutes les régions du globe à l'exception de l'Antarctique et du Groenland, elles font état d'un remarquable succès écologique dans une grande variété d'écosystèmes et d'adaptations évolutives originales. Enfin, toutes les espèces de fourmis sont eusociales et constituent des sociétés parmi les plus complexes du règne animal, notamment de par leur division du travail très sophistiquée où différentes castes sont généralement distinguables par leurs caractéristiques morphologiques et/ou leurs différences comportementales (voir section II.1), mais aussi de par leur système de communication chimique relativement élaboré parmi l'ensemble des insectes sociaux (Hölldobler & Wilson, 1990).

Pour la plupart des espèces de fourmis, l'olfaction occupe une place prépondérante dans la majorité des aspects de leur vie et de leurs activités comportementales (Hölldobler & Wilson, 1990). En effet, les odeurs environnementales, que nous appellerons « **odeurs générales** » par la suite, jouent par exemple un rôle central dans la localisation du nid ou lors des activités de fourragement. En percevant les odeurs émises par les plantes ou les proies dont elles se nourrissent, elles vont pouvoir s'orienter, localiser et évaluer leurs ressources alimentaires. Dans le cadre de leur vie sociale, d'autres odeurs, que nous appellerons « **odeurs sociales** », jouent un rôle primordial dans la communication intraspécifique, essentiellement basée sur l'action de phéromones sexuelles et non-sexuelles (e.g., phéromones de piste ou d'alarme libérées par des glandes spécifiques), dans la communication interspécifique (certaines espèces ont des interactions symbiotiques avec d'autres êtres vivants), pour le soin au couvain, ou encore dans le cadre de la reconnaissance coloniale à l'aide de substances odorantes présentes sur la surface du corps (i.e. les hydrocarbures cuticulaires). Ainsi, les odeurs générales et sociales, qui sont principalement des mélanges de plusieurs composés chimiques, doivent être détectées, traitées et reconnues par le système olfactif des fourmis afin d'assurer leur survie et leur succès reproductif mais aussi pour assurer le maintien de l'organisation de la colonie.

En dépit du rôle central des odeurs chez les fourmis et de la sophistication de leur comportement malgré leur cerveau de petite taille, déjà admiré par Darwin¹, cet insecte est demeuré longtemps absent des domaines de la perception, de l'apprentissage et de la mémoire olfactifs tant au niveau comportemental que neurophysiologique. Comme nous l'avons dit précédemment, chez les insectes, la majorité des études portant sur ces domaines a pour l'essentiel privilégié les modèles abeille et drosophile. Pourtant, les structures cérébrales impliquées dans le traitement et l'apprentissage des odeurs (i.e. les lobes antennaires et les corps pédonculés) sont particulièrement développées chez les fourmis et figureraient même parmi les plus développées chez les insectes (Gronenberg, 1999, 2001; Ehmer & Gronenberg, 2004; Kleineidam & Rössler, 2009). Enfin, leurs capacités d'apprentissage et de mémoire olfactifs ont depuis longtemps été remarquées (Vowles, 1964).

Ces dernières années, le nombre d'études portant sur la perception, l'apprentissage et la mémoire des odeurs s'est largement accru chez différentes espèces de fourmis, faisant ainsi de cet insecte un nouveau modèle d'étude. En effet, la description détaillée de leur système olfactif (voir section II.3.a), la mise au point de différentes techniques d'enregistrement de leur activité cérébrale (voir section II.3.b) et de protocoles de conditionnement individuels dans des conditions contrôlées de laboratoire (voir section II.2.a) permettent aujourd'hui d'aborder ces différents domaines tant au niveau comportemental que neurophysiologique.

1) La fourmi, un insecte eusocial

L'eusocialité représente le degré d'organisation sociale le plus complexe qu'une espèce animale puisse exprimer. Elle est définie par une coopération des soins aux jeunes, une division du travail reproducteur et par un chevauchement des générations capables de contribuer aux différentes tâches de la colonie (Oster & Wilson, 1978).

La **division du travail** reproducteur s'accompagne généralement de différences morphologiques, physiologiques et comportementales. Chez les fourmis, la reproduction au

¹ Dans son livre *The descent of man, and selection in relation to sex*, Darwin écrit au sujet des fourmis : "... yet their cerebral ganglia are not so large as the quarter of a small pin's head... [yet] the brain of an ant is one of the most marvellous atoms of matter in the world, perhaps more so than the brain of man." (Darwin, 1871)

sein de la colonie est généralement assurée par une ou plusieurs gynes (ou reines), on parle alors de monogynie et polygynie, respectivement. Ces gynes ont préalablement été fécondées par un ou plusieurs mâles, on parle alors de monoandrie et de polyandrie, respectivement. Les mâles ont une courte espérance de vie dans la mesure où ils meurent rapidement après l'accouplement tandis que les gynes ont une espérance de vie plus longue (plusieurs années) et assurent la production des ouvrières et des individus reproducteurs, qui eux, quitteront la colonie lors de l'essaimage. Des différences morphologiques entre les castes reproductrices et les ouvrières sont souvent observées chez les fourmis. Les sexués possèdent des ailes (**Figure 5**), permettant leur dispersion lors de l'essaimage (après l'accouplement, les gynes perdent leurs ailes et fondent leur colonie). De plus, les gynes sont généralement plus grosses que les ouvrières et possèdent un thorax plus large contenant les muscles alaires. Elles possèdent également une spermathèque et des ovaires développés afin d'assurer la reproduction. Les ouvrières, en revanche, n'ont généralement pas de spermathèque et possèdent des capacités reproductrices réduites voire inexistantes bien qu'elles puissent parfois, en l'absence de la reine, produire des mâles qui sont haploïdes (Hölldobler & Wilson, 1990).

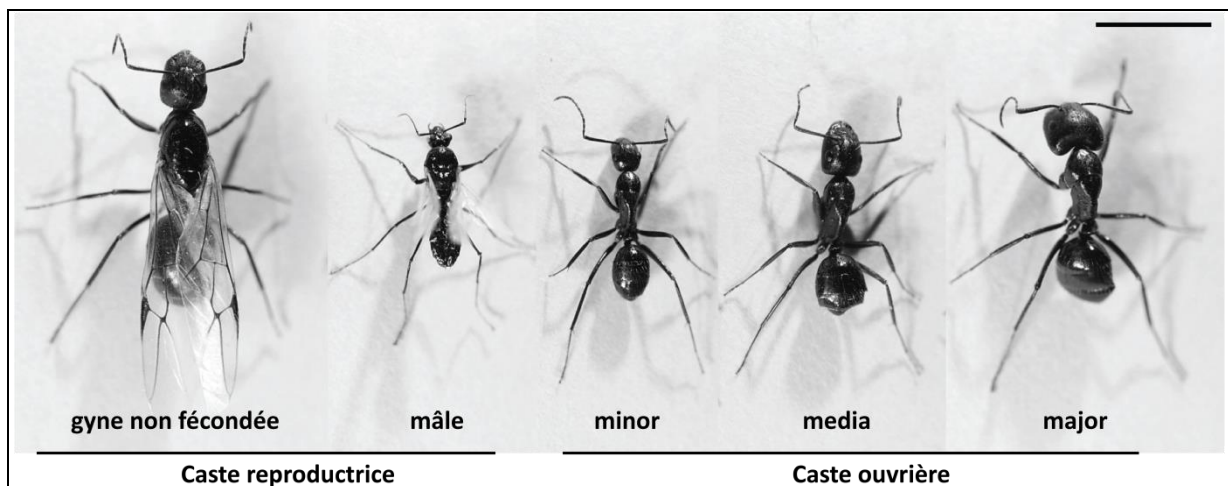
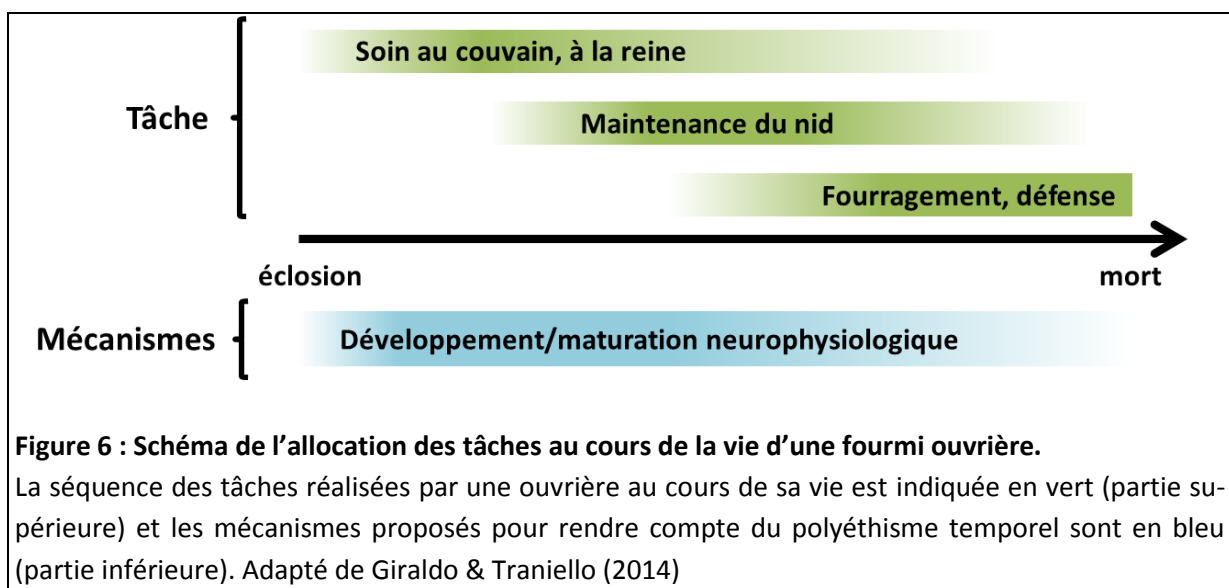


Figure 5 : Polymorphisme chez la fourmi *Camponotus aethiops*.

La caste reproductrice (gyne et mâle) et la caste ouvrière présentent des différences morphologiques. Les mâles et les gynes (avant fécondation) sont ailés tandis que les ouvrières sont aptères. Les gynes sont plus grosses que les ouvrières et possèdent un thorax plus large contenant les muscles alaires. Un polymorphisme chez les ouvrières est également observé avec trois sous-castes: ouvrières *minor*, *media* et *major*. Echelle graphique : 1cm.

Chez les ouvrières, des **castes comportementales** assurent des tâches différentes au sein de la colonie. Le terme de caste comportementale s'applique ici à un groupe d'individus spécialisés dans la réalisation d'une tâche à plus ou moins long terme (Oster & Wilson, 1978). Ces tâches sont généralement réalisées par des individus d'âge différent, on parle alors de **polyéthisme temporel** ou polyéthisme d'âge (Oster & Wilson, 1978; Hölldobler & Wilson, 1990) (**Figure 6**). Dans ce cadre, il est classiquement observé que les fourmis les plus jeunes réalisent les tâches à l'intérieur du nid telles que le soin au couvain (nourrissage des larves et aide à l'éclosion des cocons de nymphose) et le soin à la reine. Par la suite, elles délaisseront le soin au couvain et à la reine, qui sera assuré par les ouvrières plus jeunes, et s'occuperont de la maintenance du nid. Plus tard, lorsqu'elles seront plus âgées, elles effectueront les tâches à l'extérieur du nid telles que le fourragement ou la défense de la colonie.



Chez quelques espèces de fourmis, un **polymorphisme** au sein de la caste ouvrière est également observé. Ainsi, on peut par exemple distinguer trois *sous-castes* : les ouvrières *minor*, les ouvrières *media* et les ouvrières *major* (**Figure 5**). Le polymorphisme dans la caste ouvrière est souvent étroitement lié à la réalisation de tâches différentes, bien que la division du travail entre les sous-castes ne soit pas totalement stricte. Les ouvrières *minor* seraient ainsi davantage impliquées dans le soin au couvain, les ouvrières *media* dans le fourragement et les ouvrières *major* dans la défense de la colonie ou le transport des proies

les plus lourdes (Hölldobler & Wilson, 1990). Notons ici que le polyéthisme de caste peut se superposer au polyéthisme temporel. Par exemple, des ouvrières *minor* réalisant les tâches à l'intérieur du nid lorsqu'elles sont jeunes iront plus tard fourrager lorsqu'elles seront plus âgées.

L'absence de tout contrôle hiérarchique dans la division du travail a conduit de nombreux chercheurs à identifier et comprendre les mécanismes sous-tendant le polyéthisme. Ainsi, différents modèles ont été proposés pour expliquer l'émergence de la division du travail (pour revue, Beshers & Fewell, 2001). Parmi ces modèles, le **modèle des seuils de réponse** est celui qui est le plus communément accepté.

Le modèle des seuils de réponse stipule que les individus de la colonie ont des sensibilités différentes aux stimuli associés à la réalisation d'une tâche. Cette variation interindividuelle des seuils de réponse parmi les ouvrières de la colonie serait à l'origine de la division du travail (Robinson, 1992; Bonabeau et al., 1998; Theraulaz et al., 1998; Beshers & Fewell, 2001). Ainsi, chaque ouvrière de la colonie posséderait pendant une période plus ou moins longue, un seuil interne fixe de réponse pour chaque tâche du répertoire comportemental (Robinson, 1992; Bonabeau et al., 1996, 1998). Une ouvrière réalisera une tâche dès lors que le stimulus qui lui est associé dépasse son seuil interne de réponse. Par conséquent, les individus les plus sensibles aux stimuli associés à une tâche se spécialisent dans cette dernière (Beshers & Fewell, 2001; Page & Erber, 2002). Ce modèle suggère donc que les individus de la colonie sont totipotents et qu'ils possèdent tous un seuil pour une tâche donnée. De ce fait, l'augmentation du niveau d'un stimulus résulte en un recrutement d'ouvrières supplémentaires pour réaliser la tâche associée, puisque les seuils d'un plus grand nombre d'individus seraient dépassés. Des variations interindividuelles dans les seuils de réponse ont par exemple été montrés dans le cadre de la ventilation du nid chez le bourdon et chez l'abeille (O'Donnell & Foster, 2001; Weidenmüller, 2004; Jones et al., 2004) et dans le cadre du fourragement chez cette dernière (Page et al., 2006). En effet, chez l'abeille, les seuils de réponse à des solutions sucrées de diverses concentrations s'avèrent fortement corrélés à la nature des ressources (eau, pollen ou nectar) qu'elles fourragent, les fourrageuses de pollen et d'eau ayant des seuils inférieurs à ceux des fourrageuses de nectar (Page et al., 1998; Pankiw & Page, 2000; Pankiw et al., 2001; Scheiner et al., 2004; Page et al., 2006). De plus, les seuils de réponse au sucre d'ouvrières émergentes sont

également corrélés avec la nature des ressources qu'elles exploitent lorsqu'elles commencent à fourrager (e.g., les ouvrières ayant les seuils les plus bas à l'émergence se spécialisent en fourrageuses de pollen) (Pankiw & Page, 2000; Pankiw et al., 2004). Ainsi, la variabilité interindividuelle dans les seuils de réponse au sucre permettrait d'expliquer l'émergence des spécialisations dans le comportement de fourragement. Bien que des études aient montré chez des fourrageuses de diverses espèces de fourmis qu'il existait des différences dans les seuils de réponse au sucre (Falibene & Josens, 2012) et qu'il y avait un effet de la concentration de sucre sur la réponse comportementale dans le cadre du recrutement (Hangartner, 1969, 1970; Verhaeghe, 1982; de Biseau et al., 1991; Beckers et al., 1993; Schilman, 2011) ou de la consommation de sucre (Shetty, 1982; Josens et al., 1998; de Biseau & Pasteels, 2000; Falibene et al., 2009), aucune étude n'a, à ce jour, démontré de lien direct entre la variabilité interindividuelle dans les seuils de réponse au sucre et la spécialisation comportementale chez la fourmi.

Il a été montré chez différentes espèces de fourmis présentant un polymorphisme au sein de la caste ouvrière, que les ouvrières *major* et *minor* diffèrent quant à leurs réponse à des stimuli de recrutement dans le cadre du fourragement et de la défense du nid (Detrain & Pasteels, 1991, 1992; Salzemann & Jaffe, 1991; Whitehouse & Jaffe, 1996; Hughes & Goulson, 2001; Kleineidam et al., 2007). Cependant, aucune étude n'a mis en évidence que les individus d'une même sous-caste physique présentaient une variabilité interindividuelle dans des seuils de réponse et que cette dernière était corrélée à la spécialisation comportementale des individus.

Le polyéthisme temporel pourrait être expliqué par des changements de seuils de réponse au cours de la vie de l'ouvrière (Robinson, 1987) puisqu'il a été montré que la séquence des tâches réalisées accompagne un processus développemental (Robinson, 1992) (**Figure 6**). Ainsi, le changement d'activité traduirait une maturation physiologique telle qu'une augmentation du volume de certaines structures cérébrales, notamment celles impliquées dans la perception et la mémoire des odeurs (Gronenberg et al., 1996; Muscedere & Traniello, 2012; Kamhi & Traniello, 2013). Ces modifications permettraient ainsi une expansion du répertoire comportemental de l'individu (rappelons ici que la majorité des comportements de la fourmi repose sur l'olfaction) et seraient adaptées dans un contexte de fourragement. De plus, une étude chez *Camponotus floridanus* a montré que

l'augmentation du volume des structures impliquées dans la perception et la mémoire des odeurs était également dépendante de l'activité comportementale et de l'expérience olfactive des individus (Gronenberg et al., 1996). En effet, le volume des CP de nourrices n'ayant pas de couvain ou de reine à soigner (peu d'expérience olfactive et d'activité motrice) est inférieur à celui de nourrices, non privées de couvain, et à celui de fourrageuses.

La maturation physiologique serait quant à elle dépendante des variations du taux d'hormones du développement telles que l'hormone juvénile (Robinson, 1992; Dolezal et al., 2012) ou des niveaux d'amines biogènes (Taylor et al., 1992; Wagener-Hulme et al., 1999; Schulz & Robinson, 1999; Schulz et al., 2004; Seid & Traniello, 2005; Seid et al., 2008; Wnuk et al., 2011; Muscedere et al., 2012; Kamhi & Traniello, 2013), qui sont à la fois des neurohormones, des neuromodulateurs et des neurotransmetteurs (Blenau & Baumann, 2001). A ce titre, des administrations de méthoprène, un analogue à l'hormone juvénile, ou d'amines biogènes telles que l'octopamine accélèrent le polyéthisme temporel (O'Donnell & Jeanne, 1993; Schulz & Robinson, 2001; Schulz et al., 2002), étayant ainsi cette hypothèse.

Chez la fourmi, des variations dans la sensibilité à certains stimuli en fonction de l'âge ont déjà été rapportés dans la littérature. Ainsi, chez *Myrmica rubra* la réactivité aux phéromones de piste et à des phéromones de recrutement augmente avec l'âge (Cammaerts-Tricot, 1974; Cammaerts-Tricot & Verhaeghe, 1974), permettant ainsi le recrutement des individus les plus âgés vers une source de nourriture ou vers un intrus. Chez *Lasius niger*, les fourrageuses sont plus sensibles à la lumière (lumière rouge) que les nourrices (Depickère et al., 2004), les prédisposant ainsi à quitter le nid afin d'accomplir des tâches extérieures telles que le fourrage. Les variations de sensibilité aux stimuli pourraient donc être sous-tendues par les processus de maturation physiologique et expliqueraient la succession des tâches accomplies par les ouvrières en fonction de leur âge. Bien que ces travaux aient montré un effet de l'âge ou de la caste sur la sensibilité à certains stimuli, ceux de Cammaerts-Tricot (1974, 1974) se sont intéressés à l'effet de l'âge sans pour autant préciser la spécialisation comportementale des différents individus (e.g., nourrices ou fourrageuses) et ceux de Depickère et collaborateurs (2004) n'ont analysé l'effet de la lumière rouge chez les nourrices et les fourrageuses qu'à une échelle collective. En conséquence, aucune étude des seuils de réponse (mesure individuelle de la sensibilité aux

stimuli) chez des castes exécutant différentes tâches en fonction de leur âge n'a encore été réalisée chez la fourmi.

2) Apprentissage et mémoire olfactifs chez la fourmi

Les capacités d'apprentissage et de mémoire olfactifs ont depuis longtemps été montré chez les fourmis dans le cadre de la reconnaissance coloniale (pour revue, d'Ettorre & Lenoir, 2010), du fourragement (Littleddyke & Cherrett, 1978; Roces, 1990; Johnson, 1991; Beckers et al., 1994; Roces, 1994; Dornhaus & Franks, 2008) ou des odeurs associées au nid (Vowles, 1964; Jaison, 1980; Dejean, 1990; Djieto-Lordon & Dejean, 1999).

Cependant, le premier protocole d'apprentissage olfactif individuel en conditions contrôlées de laboratoire, n'a été établi que récemment (Dupuy et al., 2006). Dans cette étude pionnière, des fourmis *Camponotus mus* et *Camponotus fellah* étaient entraînées individuellement à différencier deux odeurs dans un labyrinthe en Y dans lequel elles pouvaient se déplacer librement. Dans un des bras, une odeur (SC+) était positivement renforcée avec une solution sucrée (stimulus appétitif) tandis que dans le second bras, une autre odeur (SC-) était négativement renforcée avec de la quinine, une substance amère (stimulus aversif). Au cours des essais, les fourmis des deux espèces étudiées apprenaient à discriminer les odeurs et lors du test de rappel, où les bras contenaient uniquement les odeurs conditionnées, les fourmis choisissaient préférentiellement et passaient significativement plus de temps dans le bras contenant l'odeur qui avait été préalablement associée au sucre. Ainsi, cette expérience montrait clairement la nature associative de l'apprentissage olfactif chez la fourmi; la forme d'apprentissage impliquée, (i.e. conditionnement opérant, pavlovien ou les deux), ne pouvant être précisée (Dupuy et al., 2006).

Par la suite, d'autres études ont utilisé ce type de dispositif ou d'autres formes de dispositif afin de procéder à des conditionnements olfactifs individuels de fourmis libres de leur mouvement (Josens et al., 2009; Bos et al., 2010, 2012). Bien que l'ensemble de ces études se soient montrées pertinentes dans l'étude de l'apprentissage et de la mémoire olfactifs, l'utilisation de fourmis libres de leur mouvement ne permet pas de contrôler précisément la durée ou la séquence de présentation des stimuli, l'intervalle inter-essai (IIE)

ou inter-stimulus, ou encore le nombre de fois où l'individu fait l'expérience des stimuli appétitif et aversif. Ces paramètres s'avèrent pourtant cruciaux dans les processus impliqués dans l'apprentissage et la mémoire (Menzel, 1999; Menzel et al., 2001; Frost et al., 2012).

a) Conditionnement pavlovien olfactif appétitif de la réponse d'extension du *maxilla-labium*

Afin de contrôler les différents paramètres mentionnés ci-dessus, un protocole de conditionnement chez des fourmis en contention, où seules les antennes et les pièces buccales peuvent bouger librement (**Figures 7A-B et 8**), a été élaboré récemment (Guerrieri & d'Ettorre, 2010). Ce protocole a été adapté à partir de celui existant chez l'abeille, où les performances d'apprentissage et de mémoire olfactifs sont évaluées grâce au conditionnement pavlovien du réflexe d'extension du proboscis (REP, Takeda, 1961; Bitterman et al., 1983; Giurfa & Sandoz, 2012) (**Figure 7C**).

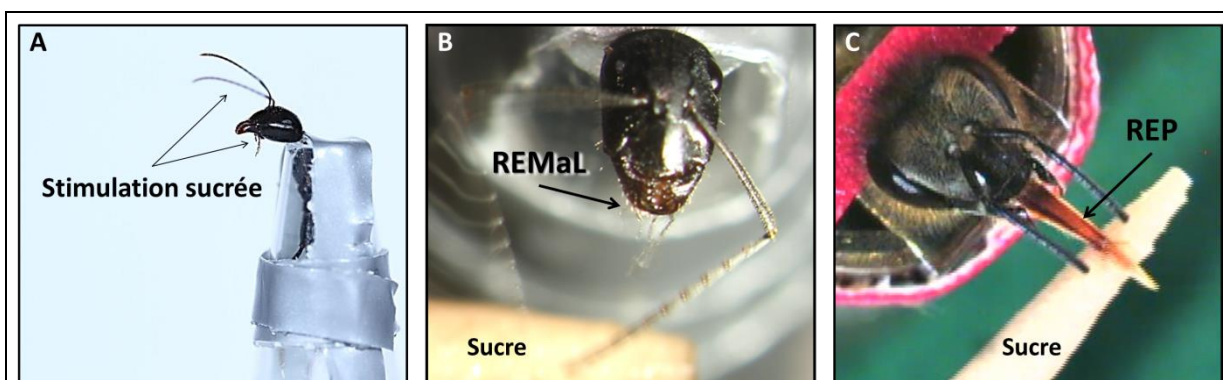


Figure 7 : Réponse d'extension du *maxilla-labium* (REMaL) de la fourmi et réflexe d'extension du proboscis (REP) de l'abeille.

A) Une ouvrière *Camponotus aethiops* en contention. Par cette méthode de fixation, seules les antennes et les pièces buccales peuvent se mouvoir. La vue de profil permet de voir les antennes et les pièces buccales, parties du corps qui peuvent être stimulées par une solution sucrée dans le but de déclencher la REMaL. **B)** La REMaL en réponse à une stimulation sucrée au niveau des antennes, chez la fourmi en contention. **C)** Le réflexe d'extension du proboscis (REP) en réponse à une stimulation sucrée au niveau des antennes, chez l'abeille en contention. La REMaL de la fourmi est ainsi l'analogue du REP de l'abeille.

Introduction

Lorsque les antennes, les tarsi ou les pièces buccales d'une abeille à jeun sont stimulées par une solution sucrée (SI), l'abeille étend de manière réflexe son proboscis (RI) afin d'ingérer la solution sucrée (**Figure 7C**). Ainsi, en appariant de manière antérograde une odeur originellement neutre (SC+) à la solution sucrée (SI), l'abeille est capable de former une association entre les deux stimuli et répondre avec le REP (RC) lors de la présentation seule de l'odeur car cette dernière aura acquis une valeur prédictive de la récompense sucrée. De manière similaire à l'abeille, des fourmis à jeun en contention étendent leur *maxilla-labium* lorsque les sensilles gustatives, présentes sur leurs antennes ou leurs pièces buccales (Gronenberg, 2008; Nakanishi et al., 2009; Mysore et al., 2009), sont stimulées avec une solution sucrée (Guerrieri & d'Ettorre, 2010; Falibene & Josens, 2012) (**Figure 7A-B**).

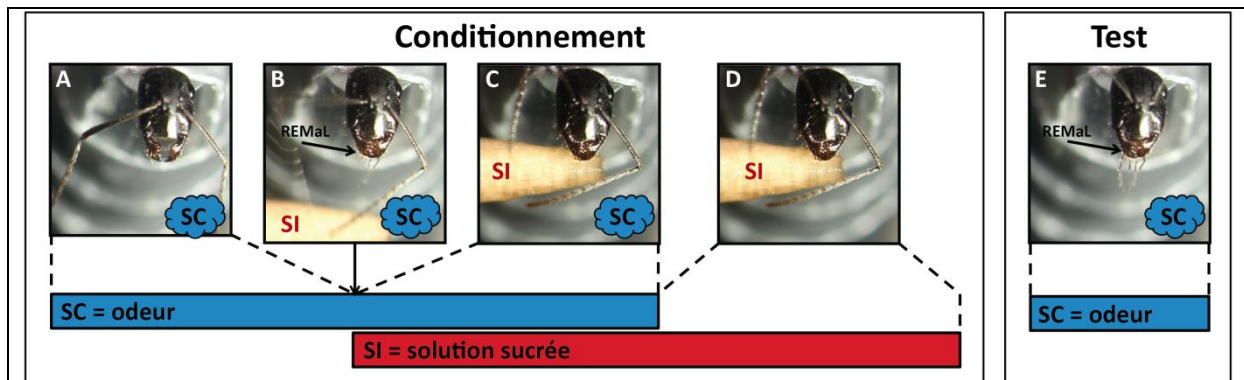


Figure 8 : Conditionnement pavlovien de la réponse d'extension du *maxilla-labium* (REMaL).

A-D) Séquence des différentes étapes du conditionnement. Comportement d'une fourmi *Camponotus aethiops* en contention au cours des différentes étapes du conditionnement (panel du haut) lors de la présentation appariée de l'odeur (SC) et de la solution sucrée (SI), où l'odeur anticipe la délivrance de la solution sucrée, résultant ainsi en un chevauchement des deux stimuli (panel du bas). **A)** Présentation de l'odeur seule. La présentation de l'odeur ne déclenche aucune réponse de la part de la fourmi puisque elle est initialement neutre pour l'individu. **B)** Présentation de la stimulation sucrée au niveau des antennes en présence de l'odeur. La fourmi présente la REMaL (RI) en réponse à la stimulation sucrée. **C)** La fourmi ingère la solution sucrée en présence de l'odeur. **D)** La fourmi continue d'ingérer la solution sucrée alors que l'odeur n'est plus présentée. **E)** Test de rappel. Après un à plusieurs appariements odeur-sucre, la fourmi présente la REMaL lors de la stimulation avec l'odeur seule dans l'attente de la récompense sucrée puisqu'elle a associé la présentation anticipée de l'odeur à la solution sucrée.

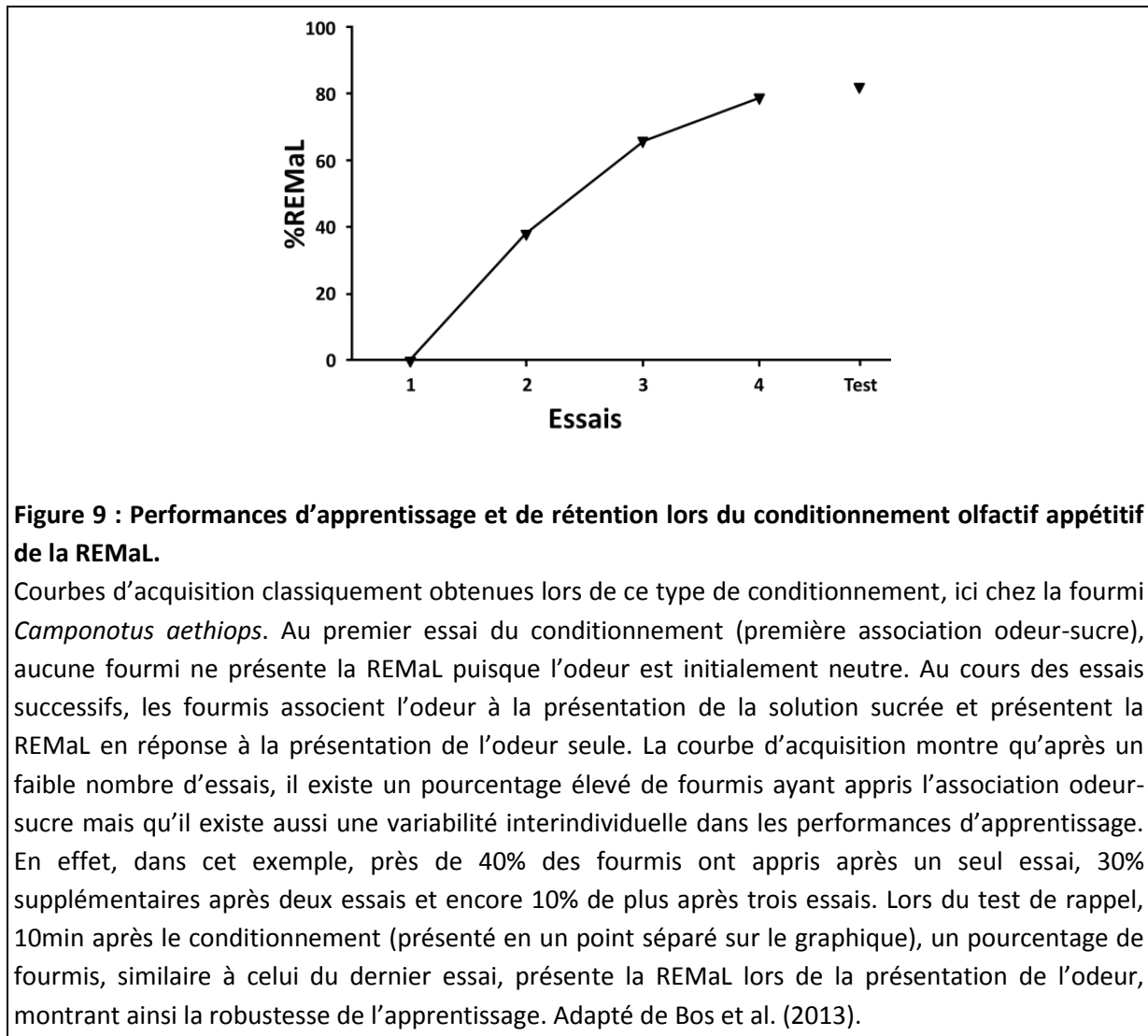
Il est alors possible de conditionner la **réponse d'extension du *maxilla-labium* (REMaL ; RI)** à une odeur originellement neutre (SC+), en appariant cette dernière à une récompense

sucrée (SI). Après un à plusieurs appariements odeur-sucre, la fourmi apprend ainsi que l'odeur anticipe la récompense sucrée. La fourmi présente par la suite la REMaL (RC) lors de la présentation de l'odeur seule (Guerrieri & d'Ettorre, 2010) (**Figure 8**).

b) Des capacités d'apprentissage variables mais remarquables

En plus de contrôler les différents paramètres de l'apprentissage, l'avantage du protocole de conditionnement de la REMaL est de pouvoir savoir à quel moment l'individu a effectivement appris. En effet, lors de ce type de conditionnement, la réponse de l'animal lors de la présentation de l'odeur est binaire (REMaL = association odeur-sucre acquise ; absence de REMaL = association odeur-sucre non acquise). Il est ainsi possible d'établir des courbes d'acquisition au cours des essais du conditionnement qui illustrent le pourcentage d'individus ayant présenté la REMaL lors de la stimulation avec l'odeur (**Figure 9**). Ces courbes montrent classiquement que le %REMaL augmente au cours des essais du conditionnement, donc que plus le nombre d'essais augmente plus le nombre d'individus ayant appris l'association odeur-sucre augmente aussi (**Figure 9**). Ceci révèle l'existence d'une variabilité interindividuelle dans les capacités d'apprentissage olfactif chez les fourmis.

Des études chez l'abeille ont révélé que les performances d'apprentissage appétitifs olfactifs ou tactiles étaient sous-tendues par des différences de sensibilité à la récompense sucrée (Scheiner et al., 1999, 2001a, 2001b) et que les performances d'apprentissage olfactif aversif étaient sous-tendues par des différences interindividuelles de sensibilité à des chocs électriques ou à des stimulations thermiques (Roussel et al., 2009; Junca et al., 2014) ; les individus les plus sensibles au stimulus appétitif et les individus les plus sensibles au stimulus aversif étant ceux montrant les meilleures performances d'apprentissage, respectivement appétitif et aversif. Il apparaît donc important de tester si la variabilité interindividuelle dans les capacités d'apprentissage olfactif appétitif, observée chez la fourmi, pourrait également dépendre de leur sensibilité à la récompense sucrée.



En dépit des différences dans les performances d'apprentissage ou dans les procédures de conditionnement (animaux libres ou en contention), les fourmis font état d'excellentes capacités mnésiques puisqu'elles sont capables de restituer l'information apprise aussi bien à court terme (5-10min après le conditionnement ; Dupuy et al., 2006; Provecho & Josens, 2009; Guerrieri & d'Ettorre, 2010; Bos et al., 2010), qu'à moyen terme (1-12h après le conditionnement ; Guerrieri & d'Ettorre, 2010; Guerrieri et al., 2011) ou qu'à long terme (24-72h après le conditionnement ; Josens et al., 2009; Guerrieri et al., 2011), comme cela a déjà été rapporté chez d'autres insectes tels que l'abeille (pour revue, Menzel, 2012), la drosophile (pour revue, Perisse et al., 2013), le grillon (Matsumoto & Mizunami, 2000, 2002) ou la blatte (Sakura & Mizunami, 2001).

3) La perception des odeurs

a) Le système olfactif de la fourmi

Chez la fourmi et plus largement chez les insectes, les antennes sont les organes sensoriels principaux pour la perception des odeurs. Sur la surface des antennes on trouve des **sensilles** qui consistent en des protubérances cuticulaires renfermant la lymphe sensillaire dans laquelle baignent les dendrites des **neurones récepteurs olfactifs (NRO)** (**Figure 10**, encadré). Chez les fourmis du genre *Camponotus*, les NRO sont hébergés par différents types de sensilles (i.e. *sensilla basiconica* présents uniquement chez les femelles, *sensilla trichodea I* (similaires aux *sensilla curvata*) et *sensilla trichodea II*) (Nakanishi et al., 2009, 2010; Mysore et al., 2010).

Les molécules odorantes plus ou moins volatiles, traversent les pores des sensilles et atteignent les dendrites des NRO grâce à des protéines de liaison des odeurs (*odorant binding proteins*) (pour revue, Leal, 2013) avant de se lier aux **récepteurs olfactifs (RO)**, qui sont des protéines à 7 domaines transmembranaires couplées à des protéines G, provoquant ainsi un potentiel récepteur (pour revue, Benton, 2006). Si le potentiel récepteur est suffisamment important, il déclenchera un potentiel d'action qui transitera le long de l'axone du NRO. Les axones des NRO forment le nerf antennaire et se projettent dans le **lobe antennaire (LA)** qui constitue le premier relais de traitement de l'information olfactive (**Figure 10**). Le LA est constitué de glomérules, des neuropiles de structure sphéroïdale, considérés comme des unités fonctionnelles du traitement olfactif (Hildebrand & Shepherd, 1997). Le LA des ouvrières du genre *Camponotus* est divisé en 7 groupements de glomérules (T1-T7), conformément à la division des tractus des axones des NRO (Zube et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Mysore et al., 2009; Nakanishi et al., 2010; Nishikawa et al., 2012).

Des études chez la drosophile ont montré que chaque NRO exprime un seul RO spécifique et que les axones des NRO exprimant le même type de RO convergent vers le même glomérule dans le LA (Clyne et al., 1999; Vosshall et al., 1999, 2000; Couto et al., 2005; Hallem & Carlson, 2004; Vosshall & Stocker, 2007).

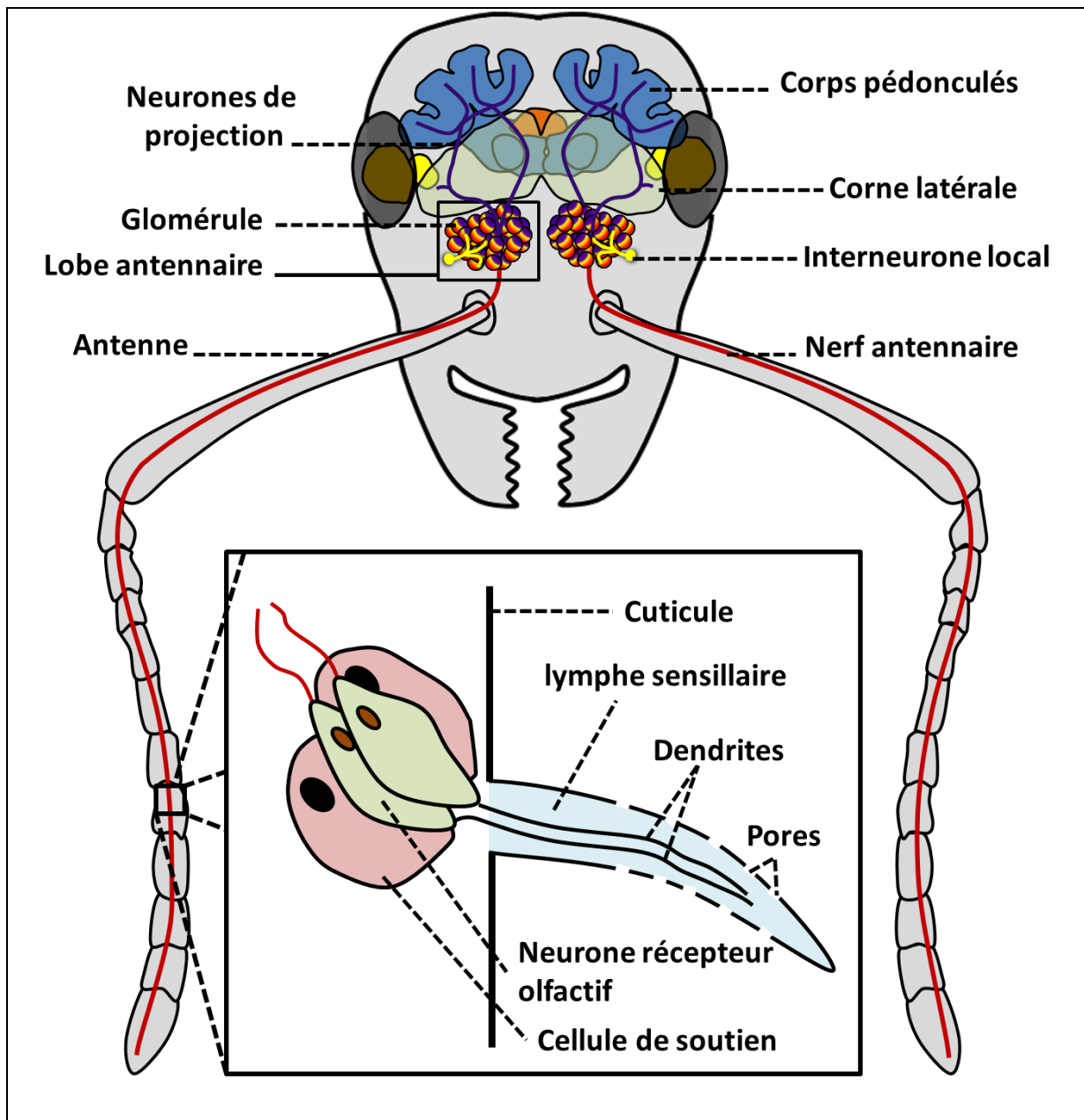


Figure 10 : Schéma du système olfactif de la fourmi.

Les molécules odorantes sont perçues au niveau des antennes grâce à des sensilles qui sont des évaginations cuticulaires contenant les dendrites des neurones récepteurs olfactifs (encadré). Les molécules traversent les pores sensillaires et se lient à des récepteurs olfactifs situés dans la membrane des dendrites des neurones récepteurs olfactifs. L'information olfactive transite ensuite le long de l'axone du neurone récepteur olfactif. L'ensemble des axones des neurones récepteurs olfactifs forment le nerf antennaire (rouge) et se projette dans le lobe antennaire, premier relais de traitement de l'information olfactive. Le lobe antennaire est constitué de glomérules qui sont des amas synaptiques entre les neurones récepteurs olfactifs (rouge), les neurones de projection (violet) et les interneurones locaux (jaune). L'information olfactive est ensuite acheminée vers les centres supérieurs du protocérébron : la corne latérale (vert) et les corps pédonculés (bleu).

Chez les espèces de fourmis étudiées jusqu'à présent, on recense chez les ouvrières entre 170 et 630 glomérules par LA (Hoyer et al., 2005; Kleineidam et al., 2005; Nishikawa et al., 2008; Zube et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Kelber et al., 2009, 2010; Kuebler et al., 2010; Mysore et al., 2009; Nakanishi et al., 2010), 450 en moyenne (organisés en plusieurs couches) chez les fourmis du genre *Camponotus* (Zube et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Nishikawa et al., 2008; Mysore et al., 2009; Nakanishi et al., 2010), comparé à 43 chez la drosophile ou 160 chez l'abeille, en faisant ainsi l'un des insectes montrant la plus grande complexité au niveau du LA (Kleineidam & Rössler, 2009). Selon la logique de la correspondance entre le nombre de RO et de glomérules, les fourmis possèderaient plusieurs centaines de gènes codant pour les récepteurs olfactifs. Un nombre élevé de glomérules, et donc par extension de RO, est généralement considéré comme l'indice d'un niveau élevé de capacités de discrimination olfactive (Kleineidam & Rössler, 2009). Comparativement à d'autres espèces d'insectes, les capacités de discrimination des fourmis se situeraient donc à un niveau relativement élevé, et nous confirment qu'elles constituent un modèle de choix dans l'étude de la perception et de l'apprentissage olfactifs. Leur sensibilité olfactive particulière s'expliquerait par le fait que, contrairement à d'autres insectes qui utilisent sensiblement le canal visuel, la majorité des espèces de fourmis ont une vie individuelle et collective largement déterminée par l'analyse de signaux olfactifs, et montrent une communication chimique des plus avancées parmi les insectes sociaux (Gronenberg, 2008).

Dans chaque glomérule, les NRO forment des connexions synaptiques avec des neurones efférents appelés **neurones de projection (NP)** (Zube et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Rössler & Zube, 2011; Nishikawa et al., 2012; pour revue, Martin et al., 2011) et des **interneurones locaux (NL)** majoritairement inhibiteurs (Christensen et al., 1998; Sachse & Galizia, 2002; Olsen & Wilson, 2008; Chou et al., 2010; Seki et al., 2010; Nishikawa et al., 2012; pour revue, Martin et al., 2011), permettant ainsi un relais de l'information vers les centres supérieurs situés dans le protocérébron : les calyces des **corps pédonculés (CP)** et la **corne latérale (CL)** (Zube et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Rössler & Zube, 2011; Nishikawa et al., 2012; pour revue, Martin et al., 2011) (**Figures 10 et 11**). Les interneurones locaux seraient organisés en différents sous-réseaux avec des fonctions différentes (Nishikawa et al., 2012; Fonta et al., 1993; Sachse & Galizia, 2002) et permettraient notamment, par des

processus de contrôle de gain et d'inhibitions latérales asymétriques (Sachse & Galizia, 2002; Olsen & Wilson, 2008), de moduler la représentation spatio-temporelle des réponses olfactives dans le LA (Stopfer et al., 1997; Christensen et al., 1998; Sachse & Galizia, 2002; Wilson & Laurent, 2005; Olsen & Wilson, 2008) afin d'affiner et d'augmenter les différences dans la représentation des odeurs dans le LA (Sachse & Galizia, 2002; Silbering & Galizia, 2007; Deisig et al., 2010; Barth et al., 2014). Par conséquent, le LA représente un véritable centre de traitement de l'information olfactive et non un simple relais de cette information.

Chez les fourmis et plus largement chez les hyménoptères, les NP relaient l'information olfactive vers les centres supérieurs *via* deux principaux tractus antenno-cérébraux (médian [TAC-m] et latéral [TAC-l]) qui sont majoritairement uni-glomérulaires et *via* trois TAC médio-latéraux (TAC-ml) qui sont eux principalement multi-glomérulaires (Abel et al., 2001; Kirschner et al., 2006; Zube et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Rössler & Zube, 2011; Nishikawa et al., 2012; Galizia & Rössler, 2010) (**Figure 11**). Les champs dendritiques des TAC-m et TAC-l sont ségrégés, formant ainsi deux hémisphères glomérulaires dans le LA (i.e. les glomérules du LA sont innervés par l'un de ces deux tractus mais pas par les deux). Leurs domaines de projection dans les CP et la CL resteraient eux aussi majoritairement séparés (Kirschner et al., 2006; Zube et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Rössler & Zube, 2011; Nishikawa et al., 2012), formant ainsi des projections à deux voies et indiquant que l'information olfactive des glomérules du LA serait traitée et transférée parallèlement aux centres supérieurs (Zube et al., 2008; Yamagata et al., 2009; Galizia & Rössler, 2010). Les TAC-ml quant à eux ne se projettent que dans la CL et le protocérébron latéral et dorsal (Kirschner et al., 2006; Zube et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Rössler & Zube, 2011; Nishikawa et al., 2012; Galizia & Rössler, 2010).

Les projections axonales des NP font synapse avec des neurones intrinsèques dans la région des lèvres et de l'anneau basal des calyces des CP : les cellules de Kenyon (Gronenberg, 2001; Zube et al., 2008; Galizia & Rössler, 2010; Rössler & Zube, 2011; Nishikawa et al., 2012). Les signaux de divers systèmes sensoriels (e.g., visuel) sont intégrés dans les CP (Gronenberg & López-Riquelme, 2004; Ehmer & Gronenberg, 2004) afin de permettre une sortie comportementale (Okada et al., 2003). Les CP seraient impliqués dans l'apprentissage et la mémoire olfactifs (Vowles, 1964; Menzel et al., 1974; Erber et al., 1980; Heisenberg et al., 1985; Schwaerzel et al., 2003) et dans de nombreux processus cognitifs

(Giurfa, 2003, 2007) tandis que la CL serait impliquée dans le traitement de l'information olfactive indépendamment de l'expérience (Heimbeck et al., 2001).

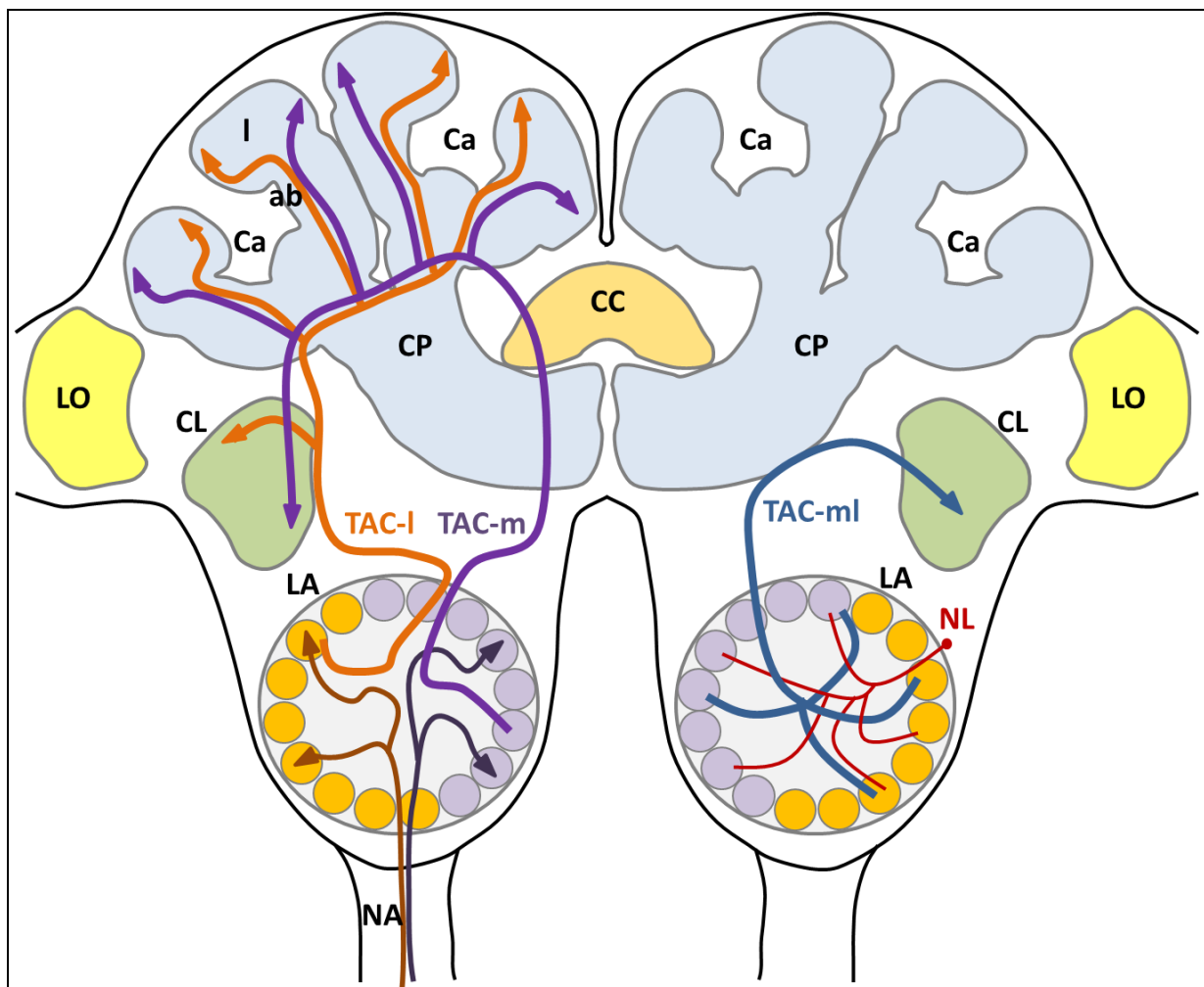


Figure 11 : Schéma du traitement de l'information olfactive chez la fourmi.

L'information olfactive qui arrive au lobe antennaire (LA) par le nerf antennaire (NA) est ensuite transférée aux centres supérieurs par les neurones de projections après traitement par les interneurones latéraux (NL). Les projections vers les centres supérieurs s'effectuent via deux principaux tractus antenno-cérébraux : le tractus antenno-cérébral médian (TAC-m, en violet) et le tractus antenno-cérébral latéral (TAC-I, en orange) qui sont majoritairement uni-glomérulaires (partie gauche du schéma). Les champs dendritiques des TAC-m et TAC-I sont ségrégués formant deux hémisphères glomérulaires dans le LA. Les TAC-I se projettent dans la région dorso-latérale de la corne latérale (CL) puis dans l'anneau basal (ab) et les lèvres (l) des calyces (Ca) des corps pédonculés (CP), où l'on trouve les cellules de Kenyon. Les TAC-m se projettent généralement dans d'autres régions de l'anneau basal et des lèvres des calyces des CP puis dans la région ventro-médiane de la CL. Leurs domaines de projection dans les CP et la CL restent majoritairement séparés, formant ainsi des projections à deux voies et indiquant que l'information olfactive des glomérules du LA serait traitée et transférée parallèlement aux centres supérieurs. Trois TAC médio-latéraux (TAC-mi, en bleu) qui sont eux principalement multi-glomérulaires, ne se projettent que dans la CL et le protocérébron latéral (partie droite du schéma). CC : complexe central; LO : lobe optique.

Il est intéressant de noter que chez les fourmis, on observe généralement un dimorphisme sexuel et un dimorphisme de caste dans l'organisation du système olfactif. Effectivement, des variations dans le volume (Hoyer et al., 2005; Kleineidam et al., 2005; Zube & Rössler, 2008; Mysore et al., 2009; Kuebler et al., 2010; Kelber et al., 2010; Nakanishi et al., 2010), le nombre (Hoyer et al., 2005; Nishikawa et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Mysore et al., 2009; Kuebler et al., 2010; Nakanishi et al., 2010) ou l'innervation des glomérules (Zube & Rössler, 2008) ainsi que dans le nombre et la répartition des sensilles le long de l'antenne (Dumpert, 1972; Nakanishi et al., 2009; Mysore et al., 2010) ont été rapportées au sein de la caste reproductrice, entre les sous-castes ouvrières et entre les castes reproductrice et ouvrières. Par exemple, chez différentes espèces du genre *Camponotus*, on trouve généralement un nombre inférieur de glomérules chez les mâles comparativement aux femelles (Nishikawa et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Mysore et al., 2009; Nakanishi et al., 2010) et un nombre supérieur de glomérules chez les ouvrières *minor* comparativement aux ouvrières *media/major* (Zube & Rössler, 2008; Mysore et al., 2009). Ces différences dans le nombre de glomérules sont corrélées avec des différences dans le nombre de sensilles entre les différentes castes (Nakanishi et al., 2009; Mysore et al., 2010). Par exemple, les mâles ne possèdent pas de sensille basiconique (Nakanishi et al., 2009; Mysore et al., 2010) et ont un groupement de glomérules en moins comparé aux femelles (Nishikawa et al., 2008; Zube & Rössler, 2008; Nakanishi et al., 2010), groupement qui recevrait très probablement les projections axonales des NRO renfermés dans ces fameuses sensilles (Nakanishi et al., 2010; Nishikawa et al., 2012). Il est de ce fait proposé que ce groupement de glomérules serait impliqué dans le traitement de certaines odeurs sociales ou nécessaires à la réalisation de tâches spécifiquement faites par les femelles (e.g., soin au couvain ou construction du nid) (Nishikawa et al., 2012). Les différences dans l'organisation des LA entre les sous-castes ouvrières pourraient être impliquées dans les variations de réponses comportementales à des stimuli de nature olfactive, rapportées pour le genre *Camponotus* (Hölldobler & Wilson, 1990). En effet, les ouvrières *minor* et *media* sont plus impliquées dans le fourragement que les ouvrières *major*, qui elles, sont plus impliquées dans la défense du nid. De la même manière, des variations dans les volumes relatifs des CP ont été rapportées chez des espèces de *Camponotus* en fonction du sexe, de la caste, de l'âge ou des tâches comportementales effectuées par les ouvrières (Gronenberg et al., 1996; Ehmer & Gronenberg, 2004; Nishikawa et al., 2008; Mysore et al., 2009). Ainsi, des

fourrageuses *minor* pourraient avoir de meilleures capacités d'apprentissage olfactif par exemple que les autres castes physiques (i.e. ouvrières *major*) ou comportementales (i.e. nurses).

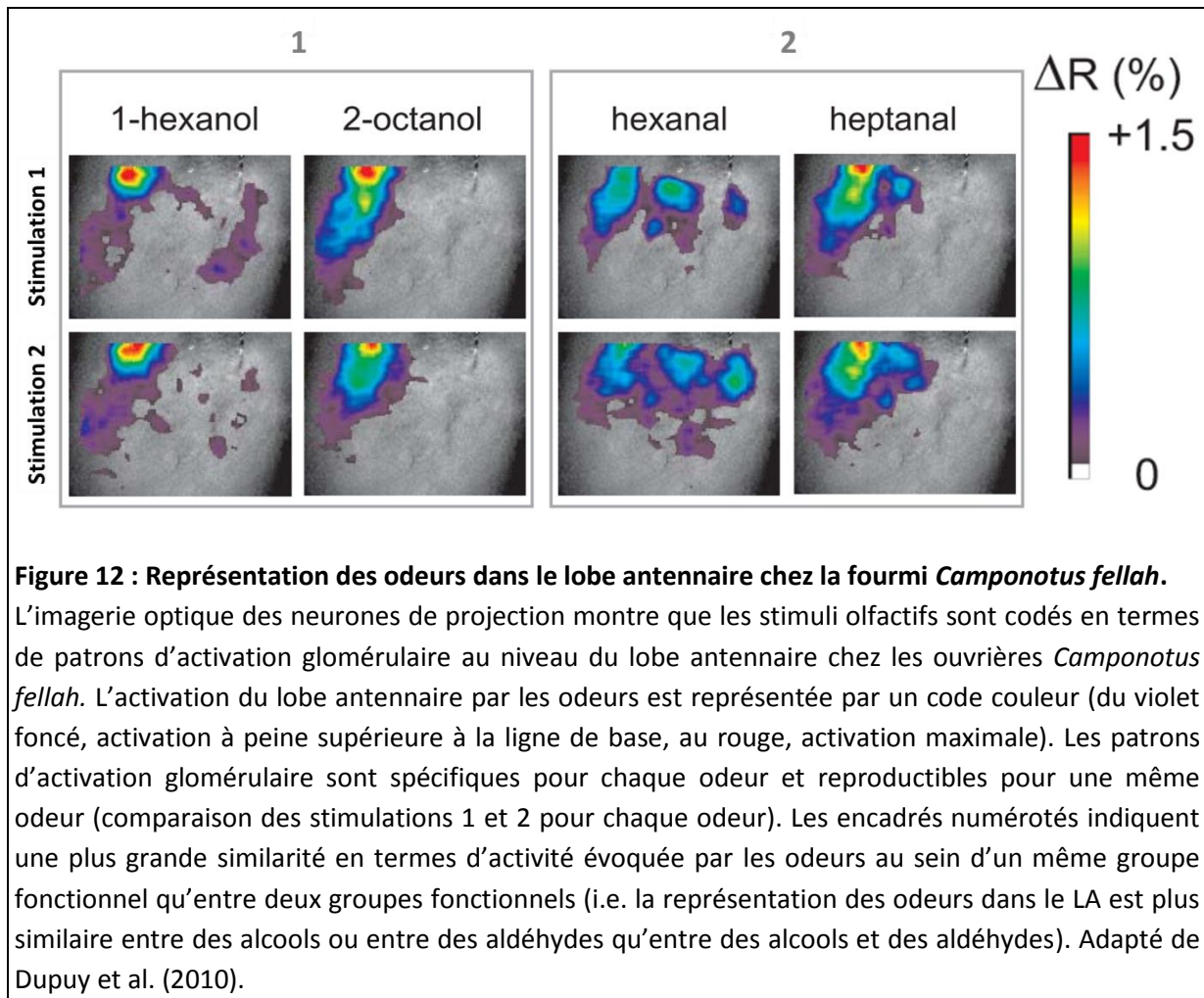
b) La représentation des odeurs dans le système nerveux

Afin de mieux comprendre comment les stimuli olfactifs sont représentés dans le système nerveux, différentes techniques visant à enregistrer les modifications d'activité cérébrale provoquées par la présentation des odeurs, ont été élaborées chez l'insecte. Par exemple, l'imagerie optique (Joerges et al., 1997; Galizia et al., 2000; Fiala et al., 2002; Wang et al., 2003) ou l'électrophysiologie (Stopfer et al., 1997; Mazor & Laurent, 2005) se sont avérées particulièrement utiles dans l'étude du traitement olfactif. Ces deux techniques ont été adaptées avec succès chez la fourmi, bien que l'imagerie calcique soit la technique la plus utilisée (Dumpert, 1972; Galizia et al., 1999*b*; Yamagata et al., 2005, 2006, 2007; Zube et al., 2008; Kuebler et al., 2010; Brandstaetter et al., 2010; Dupuy et al., 2010; Brandstaetter & Kleineidam, 2011; Brandstaetter et al., 2011). Elle consiste à mesurer les variations de niveaux de calcium intracellulaire à l'aide de sondes calciques fluorescentes et repose sur le fait que l'activation d'un neurone s'accompagne d'une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium, liée à une entrée massive depuis le milieu extracellulaire mais aussi à la libération de stocks présents dans la cellule.

L'emploi de l'imagerie calcique chez la fourmi et d'autres insectes a permis de mettre en évidence que les odeurs sont représentées en termes de patrons d'activation spatio-temporelle dans les glomérules du lobe antennaire (Joerges et al., 1997; Galizia et al., 1999*b*, 1999*a*; Sachse et al., 1999; Fiala et al., 2002; Wang et al., 2003; Zube et al., 2008; Dupuy et al., 2010; Brandstaetter et al., 2010, 2011) (**Figure 12**). Ces patrons d'activation sont spécifiques pour chaque odeur (Joerges et al., 1997; Galizia et al., 1999*b*, 1999*a*; Sachse et al., 1999; Wang et al., 2003; Zube et al., 2008; Dupuy et al., 2010; Kuebler et al., 2010), symétriques entre les deux LA (Galizia et al., 1998; Sandoz et al., 2003; Dupuy et al., 2010) et montrent une reproductibilité intra et interindividuelles pour une même odeur (Galizia et al., 1999*b*, 1999*a*; Sachse et al., 1999; Wang et al., 2003; Zube et al., 2008; Dupuy et al., 2010; Brandstaetter et al., 2011) (**Figure 12**). Au sein du lobe antennaire, chaque odeur est codée

Introduction

par l'activité de plusieurs glomérules et chaque glomérule participe au codage de plusieurs odeurs (i.e. les patrons d'activation se chevauchent) (Joerges et al., 1997; Galizia et al., 1999a, 1999b; Sachse et al., 1999; Wang et al., 2003; Zube et al., 2008; Dupuy et al., 2010). Ainsi, la qualité de l'odeur serait représentée dans le LA par une combinaison de glomérules activés (**Figure 12**).



Puisque le codage des odeurs repose sur une représentation combinatoire de glomérules activés, il est légitime de proposer qu'avec un plus grand nombre de glomérules, un plus grand nombre de combinaisons pourraient être effectuées et donc que les capacités olfactives seraient accrues. Ainsi, la fourmi étant l'un des insectes présentant à ce jour la plus grande complexité au sein du LA en terme de nombre de glomérules (voir section II.3.a),

elle possèderait des capacités olfactives particulièrement remarquables au sein de cette classe d'animaux.

Chez les ouvrières du genre *Camponotus*, les odeurs sociales (les phéromones non sexuelles ou les odeurs coloniales) sont elles aussi représentées en terme de patrons d'activation de plusieurs glomérules (Galizia et al., 1999b; Zube et al., 2008; Brandstaetter et al., 2010, 2011; Brandstaetter & Kleineidam, 2011) et chevaucheraient la représentation des odeurs générales (Galizia et al., 1999b; Zube et al., 2008; Brandstaetter et al., 2011). En conséquence, les représentations des odeurs sociales et générales ne peuvent être distinguées au niveau du lobe antennaire. Cependant, chez les fourmis « coupeuses de feuilles », un macroglomérule présent uniquement chez les castes ouvrières impliquées dans le fourragement, répondrait de manière spécifique aux phéromones de piste (Kleineidam et al., 2005; Kuebler et al., 2010), indiquant ainsi qu'un codage spécifique puisse exister pour certaines sociales.

Dans le cas des odeurs générales, le codage dans le LA des insectes dépendrait en partie des propriétés chimiques des odeurs telles que le groupe fonctionnel ou la longueur de chaîne. En effet, des composés monomoléculaires qui partagent l'une de ces dimensions chimiques activent des patrons d'activation similaires. Par conséquent, la similarité chimique des molécules odorantes se traduirait par une similarité dans la représentation des odeurs au niveau du LA (Sachse et al., 1999; Lei et al., 2004; Guerrieri et al., 2005; Haddad et al., 2008; Dupuy et al., 2010) (**Figure 12**). Des résultats similaires ont été observés dans le bulbe olfactif des vertébrés (pour revue, Johnson & Leon, 2007). Comme nous l'avons vu précédemment, la similarité perceptuelle est corrélée à la similarité structurelle des molécules odorantes (voir section **I.2.a**). Ainsi, la similarité perceptuelle pourrait tout simplement traduire la similarité dans la représentation neuronale des odeurs similaires d'un point de vue structurel, comme cela a été proposé chez des espèces d'insectes et de vertébrés (Imamura et al., 1992; Yokoi et al., 1995; Linster & Hasselmo, 1999; Guerrieri et al., 2005; Barth et al., 2014).

A notre connaissance, aucune étude sur la représentation des odeurs dans les centres supérieurs du système olfactif (les CP et la CL) n'a été rapportée chez la fourmi. Cependant chez d'autres insectes tels que l'abeille ou la drosophile, des études ont montré

qu'au niveau des CP, les cellules de Kenyon s'activaient de manière odeur-spécifique avec un codage combinatoire et épars (Fiala et al., 2002; Perez-Orive et al., 2002; Szyszka et al., 2005; Honegger et al., 2011). Dans la CL, on retrouve également un codage odeur-spécifique qui est corrélé avec la représentation des odeurs dans le LA et qui dépend aussi des propriétés chimiques des odeurs (Roussel et al., 2014).

Concernant la représentation des mélanges d'odeurs générales dans le lobe antennaire, aucune étude n'a aujourd'hui été réalisée chez la fourmi. Cependant, des recherches sur l'abeille, la drosophile ou le papillon ont révélé que le patron d'activation glomérulaire d'un mélange binaire d'odeurs au niveau des afférences du LA (i.e. les NRO) était similaire à la combinaison des patrons évoqués par les composants du mélange (Joerges et al., 1997; Deisig et al., 2006; Silbering & Galizia, 2007; Carlsson et al., 2007; Kuebler et al., 2012; pour revue, Szyszka & Stierle, 2014). En revanche, au niveau des efférences du LA (i.e. les NP), la représentation neurale du mélange s'écartait de celle de la somme de ses composants, en raison, certainement, de l'action des NL (Silbering & Galizia, 2007; Deisig et al., 2010; Kuebler et al., 2012; pour revue, Szyszka & Stierle, 2014).

L'étude de la représentation des odeurs générales ou sociales dans le système nerveux des fourmis à l'aide de techniques d'imagerie calcique a contribué de manière significative à notre connaissance sur le traitement des odeurs chez cet insecte. Cependant, l'emploi de cette technique semble à ce jour présenter de plus grandes difficultés et limites que chez les autres insectes étudiés (e.g., Galizia et al., 1999b). En effet, la grande complexité du LA (environ 450 glomérules organisé en plusieurs couches chez les *Camponotus*) ne permet de visualiser qu'une partie très restreinte du LA [e.g., chez les fourmis du genre *Camponotus* on enregistre en moyenne 10% du nombre total de glomérules contre 25% et 50% respectivement chez l'abeille et la drosophile (Dupuy et al., 2010; Sachse et al., 1999; Guerrieri et al., 2005; Wang et al., 2003)]. De plus, l'attribution de signaux calciques à des glomérules individuels n'est souvent pas possible directement (Galizia et al., 1999b; Zube et al., 2008; Dupuy et al., 2010; Brandstaetter et al., 2010; Kuebler et al., 2010; Brandstaetter et al., 2011; Brandstaetter & Kleineidam, 2011). Enfin, l'imagerie calcique s'avère une technique délicate offrant un faible rendement en termes de nombre d'individus présentant de « bonnes » réponses calciques lors de la présentation des

odeurs [entre 2 et 25% dans les études de Zube et al. (2008), Dupuy et al. (2010) et Brandstaetter & Kleineidam (2011)].

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe une forte corrélation entre la similarité dans la représentation des odeurs dans le système nerveux et la similarité perceptuelle exprimée au niveau comportemental. Ainsi, une approche comportementale de la perception des odeurs s'avère appropriée pour tenter de comprendre comment le système olfactif des fourmis traite les odeurs et permet de s'affranchir des difficultés expérimentales rencontrées avec l'imagerie calcique. De plus, bien qu'il soit possible d'établir des corrélations entre la représentation neurale et la perception des odeurs, il n'est à ce jour pas possible de déduire directement comment un individu perçoit les odeurs à partir de la seule lecture des patrons d'activation glomérulaire suscités par ces odeurs. Par exemple, la représentation dans le LA des odeurs homo- et hétéro-coloniales sont similaires chez la fourmi *Camponotus floridanus* (du moins dans la partie imagée du LA), pourtant cette dernière est capable de les discriminer d'un point de vue comportemental (Brandstaetter et al., 2011). Par conséquent, l'approche comportementale reste une des meilleures façons de savoir comment les animaux perçoivent les odeurs.

c) Approche comportementale de l'étude de la perception des odeurs

La majorité des études conduites dans le domaine de la perception des odeurs chez la fourmi s'est principalement inscrite dans le cadre de la reconnaissance coloniale. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les fourmis possèdent sur la surface de leur cuticule des molécules odorantes, i.e. des hydrocarbures de longue chaîne carbonée, très peu volatiles, qui seraient utilisées pour discriminer les individus appartenant à leur colonie des individus étrangers (van Zweden & d'Ettorre, 2010). La plupart des études s'est ainsi intéressée aux effets de l'ajout ou du retrait de certains composants du profil cuticulaire sur la discrimination comportementale (acceptation ou rejet) des individus à qui on présentait une fourmi dont le profil cuticulaire avait été modifié. Les recherches sur la perception des odeurs générales telles que les volatils émis par les plantes, i.e. des hydrocarbures à courte chaîne carbonée, pouvant être particulièrement pertinentes dans le cadre du fourragement, sont beaucoup plus récentes et chez la fourmi (Dupuy et al., 2006; Bos et al., 2013).

L'élaboration des protocoles de conditionnement en conditions contrôlées de laboratoire, présentés dans la section **II.2.a**, permettent l'étude de la perception des odeurs chez la fourmi. Par exemple, la similarité perceptive entre les stimuli olfactifs peut être évaluée avec précision à partir de conditionnement olfactif, soit en entraînant des fourmis en conditionnement absolu (une odeur récompensée SC+), soit en entraînant des fourmis en conditionnement différentiel (une odeur récompensée SC+ vs une autre odeur non récompensée ou punie SC-). Dans les deux cas, on observe ultérieurement la réponse à des odeurs différentes de celles utilisées lors du conditionnement afin de savoir si la fourmi les perçoit comme similaires (i.e. si elle généralise de l'odeur apprise à l'odeur testée) ou dissimilaires (i.e. si elle répond d'une manière différente à l'odeur testée par rapport à l'odeur apprise). La similarité/dissimilarité perceptuelle peut ainsi être évaluée par le niveau de réponse à la nouvelle odeur relativement à celui de la réponse à l'odeur conditionnée.

i. Perception des odeurs simples

Les études portant sur la capacité des fourmis à discriminer des hydrocarbures cuticulaires ou des odeurs florales ont montré que les caractéristiques structurales des odeurs telles que la longueur de la chaîne carbonée, la classe d'hydrocarbures cuticulaires (e.g., linéaires ou ramifiés) ou le groupe fonctionnel (e.g., alcool, aldéhyde ou cétone) jouaient un rôle critique dans la perception des odeurs (*Camponotus aethiops* : Bos et al., 2012, 2013 ; *Linepithema humile* : van Wilgenburg et al., 2012). En effet, ces études ont révélé que la similarité structurale des odeurs se traduisait généralement en similarité perceptuelle, comme cela a déjà été montré chez de nombreuses espèces d'invertébrés et de vertébrés (voir section **I.2.a**). Pour autant, une forte similarité structurale entre les odeurs ne signifie pas pour autant que les fourmis ne soient pas capables de les discriminer puisqu'elles sont par exemple capables d'apprendre à différencier des odeurs ayant des longueurs de chaîne carbonée identiques et ne différant que par la position d'un groupe carbonyle (*Camponotus mus* et *Camponotus fellah* : Dupuy et al., 2006) ou d'une ramification méthyle (*Linepithema humile* : van Wilgenburg et al., 2012).

De manière intéressante, des études chez la fourmi *Camponotus aethiops* ont rapporté des cas de **généralisation asymétrique** entre des odeurs sociales ou générales (Bos et al., 2012, 2013). La généralisation entre des odeurs A et B est dite asymétrique lorsque le

niveau de réponse à l'odeur B après avoir été conditionné à l'odeur A est significativement différent du niveau de réponse à l'odeur A après avoir été conditionné à B (Sandoz et al., 2001 ; Guerrieri et al., 2005). Ainsi, Bos et ses collaborateurs (2012, 2013) ont révélé qu'au sein d'un même groupe fonctionnel ou d'une même classe d'hydrocarbure cuticulaire, les niveaux de généralisation étaient plus élevés lorsque la chaîne carbonée de l'odeur testée était plus courte que celle de l'odeur conditionnée.

Les études sur la perception des odeurs simples chez la fourmi ont jusqu'à présent utilisé un nombre d'odeurs relativement faible (par exemple, Dupuy et al. (2006) : deux couples d'odeurs), ou encore un nombre de dimensions chimiques des odeurs important au regard du nombre d'odeurs testées (par exemple, Bos et al. (2013) : 6 odeurs appartenant à 3 groupes fonctionnels différents et possédant deux longueurs de chaînes différentes). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la similarité structurelle de plusieurs molécules odorantes sur la perception des odeurs, en ne faisant varier qu'une seule dimension chimique afin de dégager un effet consistant sur la relation entre la similarité structurelle et la similarité perceptuelle des odeurs chez la fourmi. De plus, les travaux mentionnés précédemment ont utilisé des protocoles de conditionnement aussi bien absolus (Bos et al., 2012, 2013) que différentiels (Dupuy et al., 2006; van Wilgenburg et al., 2012). De ce fait, il est légitime de s'interroger sur l'effet de l'expérience olfactive de la fourmi (effet de la procédure de conditionnement) sur la similarité perceptuelle. En effet, comme nous l'avons vu précédemment (section I.2.c), l'expérience olfactive peut influencer de manière significative la représentation perceptuelle des stimuli.

ii. Perception des mélanges d'odeurs

L'unique étude s'étant intéressée à la façon dont les fourmis perçoivent les mélanges d'odeurs générales a été conduite très récemment (Bos et al., 2013). Les auteurs ont conditionné des fourmis *Camponotus aethiops* à des mélanges binaires d'odeurs variant en termes de groupe fonctionnel et de longueur de chaîne carbonée. Puis, ils ont testé la réponse des fourmis aux composés du mélange. Ils ont montré que pour certains mélanges, les fourmis répondaient plus à l'un des deux composés mais que dans la majorité des cas, les fourmis répondaient de manière similaire aux deux composés du mélange. Dans les cas où une différence de réponse était observée entre les composants du mélange, les dimensions

chimiques des odeurs semblaient jouer un rôle dans la perception du mélange (Bos et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs employaient le terme d'*overshadowing* à mauvais escient puisqu'ils ne testaient pas si la réponse au composé « dominé » après conditionnement au mélange était significativement inférieure à la réponse de ce composé après conditionnement à ce composé seulement, un critère crucial pour déterminer l'occurrence de l'*overshadowing* (voir section **1.2.b**). En conséquence, une étude du phénomène de l'*overshadowing* dans la perception des mélanges d'odeurs reste à réaliser chez la fourmi. Déterminer les règles qui gouvernent ce phénomène permettrait également de comprendre quels facteurs (e.g. les propriétés chimiques des molécules odorantes composant le mélange) jouent un rôle dans la perception des mélanges d'odeurs chez la fourmi.

Objectifs

Les études conduites dans cette thèse ont eu pour objet de progresser dans nos connaissances sur la **division du travail** et l'**apprentissage** et la **perception des odeurs** chez la fourmi *Camponotus aethiops*.

Les fourmis et les insectes sociaux en général, fascinent depuis très longtemps du fait de leur organisation sociale complexe où chaque individu réalise des tâches spécifiques au sein de la colonie. Quels facteurs sous-tendent cette division du travail ? Le modèle des seuils de réponse est souvent invoqué et différentes études chez la fourmi ont montré qu'il existait des différences dans les seuils de réponse au recrutement entre des ouvrières de tailles différentes (e.g., ouvrières *minor* et *major Pheidole pallidula* ; Detrain & Pasteels, 1991, 1992). Cependant, aucune variabilité dans la sensibilité à des stimuli impliqués dans la réalisation de tâches n'a été rapportée entre des castes comportementales appartenant à une même sous-caste physique ou au sein de la caste reproductrice chez la fourmi. Chez l'abeille, des variabilités interindividuelles dans la réponse au sucre ont été rapportées entre des fourrageuses de pollen ou de nectars. La fourmi *Camponotus aethiops* se nourrit elle aussi de substances sucrées (nectars extra-floraux), ainsi **nous avons cherché s'il existait une variabilité interindividuelle dans la réponse au sucre chez des ouvrières *minor*, appartenant à différentes castes comportementales, et chez les individus reproducteurs.**

L'ensemble des recherches dans le domaine de l'apprentissage associatif s'accorde à dire qu'il existe une variabilité interindividuelle dans les capacités d'apprentissage, certains individus apprenant plus rapidement que d'autres. Quels facteurs sous-tendent une telle variabilité ? Une hypothèse séduisante proposée par les recherches sur l'abeille est que les différences dans la capacité d'apprentissage des individus résulteraient de la variation de leur sensibilité au renforcement utilisé. De ce fait, **nous avons cherché à savoir si les performances d'apprentissage olfactif appétitif chez la fourmi étaient déterminées par leur sensibilité à la récompense sucrée.**

Objectifs

Comment les animaux perçoivent-ils leur environnement ? Comment en tirent-ils des informations pertinentes afin d'adapter leur comportement à un monde complexe en constante variation ? Autant de questions qui restent à ce jour non élucidées et qui font l'objet de nombreuses recherches dans le domaine de l'éthologie, de l'écologie comportementale, de la psychologie ou encore des neurosciences sensorielles. Ainsi dans cette thèse, nous avons tenté d'apporter des réponses à ces questions en étudiant notamment la perception et l'apprentissage des odeurs chez la fourmi. Cet animal, relativement absent des études entreprises dans ces différents domaines, est depuis peu en train de devenir un modèle. Le développement récent d'un protocole de conditionnement olfactif (Guerrieri & d'Ettorre, 2010) permet aujourd'hui d'aborder ces questions d'un point de vue comportemental et dans des conditions contrôlées de laboratoire. Nous avons ainsi utilisé ce protocole afin de savoir s'il était possible d'établir des règles prédictives en matière de perception olfactive sur la base des dimensions chimiques des odeurs, telles que la longueur de leur chaîne carbonée et le groupe fonctionnel. Chez les vertébrés et les invertébrés, des études ont montré que la similarité perceptuelle des stimuli dépendait de la similarité chimique des molécules. A ce titre, **nous avons cherché si la longueur de la chaîne carbonée était une dimension pertinente dans la similarité perceptuelle chez la fourmi.**

Une autre question centrale dans l'étude de la perception des stimuli est de savoir comment l'expérience d'un individu améliore ses capacités de discrimination perceptuelle. Les recherches sur ce sujet dans le domaine de l'olfaction sont cependant très limitées chez l'insecte et le nombre d'odeurs ou de combinaisons testées est souvent trop faible pour tenter d'établir des règles générales sur l'effet de l'expérience sur la perception des odeurs. Ainsi, un autre objectif de cette thèse a été de **savoir si un conditionnement différentiel pouvait améliorer les capacités de discrimination olfactive des sujets et si c'était le cas, de proposer un mécanisme sous-jacent à l'affinement de ces capacités de discrimination.**

L'étude de la perception des mélanges d'odeurs suscite de nombreuses questions. Les individus perçoivent-ils et apprennent-ils tous les composants d'un mélange aussi bien ou existe-t-il des interactions entre les composants d'un mélange affectant la perception de ce dernier ? Le phénomène de *overshadowing* s'avère pertinent dans l'étude de ces questions. Des études précédentes sur ce phénomène chez l'insecte, avaient utilisé un faible nombre d'odeurs (Smith, 1998), ne permettant ainsi pas de déterminer si ce

phénomène obéissait à des règles spécifiques. Avec un plus grand nombre d'odeurs, **nous avons ainsi étudié le phénomène d'*overshadowing* chez la fourmi et cherché à savoir s'il obéissait à des règles basées sur les propriétés chimiques des odeurs telles que le groupe fonctionnel et la longueur de la chaîne carbonée.**

Modèle d'étude : la fourmi *Camponotus aethiops*

Le genre *Camponotus* est un des plus répandus dans le monde (plus de 1500 espèces et sous-espèces décrites à ce jour) et se trouve dans la quasi-totalité des régions du globe. La fourmi *Camponotus aethiops*, plus précisément, est une espèce terricole, abondante dans le sud de l'Europe et en Turquie, surtout dans les habitats méditerranéens (Karaman et al., 2011). Son nid est sous-terrain.



Cette espèce est monogyne (Dartigues, 1978). Les gynes et les mâles s'accouplent en vol durant l'essaimage. Le mâle meurt rapidement après l'accouplement tandis que la gyne retourne au sol, perd ses ailes et cherche un endroit pour construire son nid où elle pond ses premiers œufs. Jusqu'à l'émergence des premières ouvrières, elle vit sur ses réserves car elle ne sort pas de son nid pour fourrager (fondation claustrale). Les nids matures atteignent plusieurs milliers d'individus (Beckers et al., 1989). Un polymorphisme dans la caste ouvrière est observé chez cette espèce avec trois sous-castes : *minor*, *media* et *major* (**Figure 5**), bien que ce polymorphisme soit plutôt continu (Dartigues, 1978). Les ouvrières *major* apparaissent plus tardivement dans la colonie, après qu'une centaine d'ouvrières des autres sous-castes aient été produites (Dartigues, 1978).

La fourmi *Camponotus aethiops* se nourrit principalement de substances sucrées provenant des exsudations végétales (nectars floraux ou extra-floraux) et de miellats sécrétés par des homoptères (e.g., pucerons ou cochenilles) qu'elle élève afin de suppléer sa diète en glucides. Elle se nourrit également de petits insectes morts, sources de protéines. Les ouvrières peuvent stocker de la nourriture dans leur jabot pendant une période plus ou moins longue afin de la redistribuer aux autres membres de la colonie en cas de pénurie ou pendant la période d'hibernation. On peut ainsi observer une physogastrie (dilatation du gastre) lorsque le jabot est plein.

Cette espèce a un rythme cathéméral : elle fourrage le jour, au crépuscule et pendant la nuit (Karaman et al., 2011; Yilmaz et al., 2014). En conséquence, elle s'appuierait davantage sur des indices olfactifs que visuels dans le cadre du fourragement bien qu'elles soient aussi capables d'associer des repères visuels « grossiers » à des solutions sucrées (Al Haddad & Delage-Darchen, 1994; Yilmaz et al., 2014). Les ouvrières patrouilleraient individuellement (Beckers et al., 1989) donc mémoriser les sources de nourriture sur la base d'indices olfactifs constitue *a priori* un processus pertinent pour optimiser leur fourragement.

Les colonies utilisées dans cette thèse ont été récoltées dans le sud de la France à Pompertuzat (près de Toulouse). Les colonies récoltées étaient constituées de plusieurs centaines d'ouvrières et de la reine et ont été conservées au laboratoire (Paris).

Synthèse des résultats principaux

Les études menées dans cette thèse ont montré qu'il existait une interaction entre la sensibilité de la réponse au sucre, la division du travail et les performances d'apprentissage olfactif appétitif chez la fourmi *Camponotus aethiops* (**Chapitre I**). En effet, nous avons révélé que les castes ouvrières *minor* (fourrageuses, nourrices et ouvrières inactives) et reproductrices (gynes et mâles) différaient dans leur seuil de réponse au sucre, ce qui est la première illustration empirique du modèle des seuils de réponse chez des castes comportementales appartenant à la même sous-caste physique et chez les individus reproducteurs chez la fourmi. Ainsi, les fourrageuses et les mâles ont montré les seuils de réponse au sucre les plus bas (ils répondaient à des solutions sucrées de faible concentration), les gynes et les ouvrières inactives avaient les seuils de réponse au sucre les plus élevés (elles ne répondaient qu'aux solutions sucrées de forte concentration), et les nourrices montraient des seuils de réponse intermédiaires. De plus, nos résultats ont révélé qu'il existait une corrélation entre le seuil de réponse au sucre et les performances d'apprentissage olfactif de la REMaL, chez les fourrageuses et les nurses. Nous avons ainsi montré que plus les individus étaient sensibles à des solutions sucrées de faible concentration, meilleure étaient leurs performances d'apprentissage olfactif appétitif. Dans nos expériences, les fourrageuses ont montré de meilleures capacités d'apprentissage que les nourrices, ce qui est en accord avec leur plus forte sensibilité à la récompense sucrée et qui s'avère pertinent dans un contexte de fourragement, dans la mesure où il leur est utile d'associer les indices de l'environnement (e.g., les odeurs) avec les sources de nourriture qu'elles visitent.

Les expériences que nous avons réalisées par la suite ont eu pour objectif de savoir s'il était possible d'établir des règles prédictives de la perception olfactive sur la base des dimensions chimiques des odeurs (longueur de la chaîne carbonée et groupe fonctionnel) et si l'expérience olfactive des individus était susceptible d'influencer relations de similarité entre les odeurs. Pour réaliser ces études, nous avons conditionné des fourrageuses à répondre à des odeurs simples ou à des mélanges et testé leur réponse aux odeurs conditionnées et à des odeurs nouvelles. Nous avons utilisé des fourrageuses dans la mesure

où cette caste avait montré les meilleures performances d'apprentissage dans notre première étude (voir ci-dessus).

Nos expériences ont ainsi montré que la chaîne carbonée était une dimension pertinente pour la perception des odeurs simples chez la fourmi *Camponotus aethiops* (**Chapitre II et III**) puisqu'au sein d'un même groupe fonctionnel (dans notre cas, les aldéhydes), plus la différence dans le nombre de carbone entre l'odeur conditionnée et l'odeur testée était importante, meilleures étaient les capacités de discrimination entre ces odeurs.

De plus, nous avons montré que l'expérience olfactive jouait un rôle déterminant dans les relations de similarité entre les odeurs puisque les fourmis sujettes à un conditionnement différentiel montraient de meilleures capacités de discrimination que des fourmis sujettes à un conditionnement absolu (**Chapitre II**). L'amélioration des capacités de discrimination olfactive concernait non seulement les odeurs conditionnées mais étaient également transférées à des odeurs auxquelles la fourmi n'avait pas été exposée lors du conditionnement. En effet, après avoir été entraînées à différencier deux aldéhydes différant de deux carbones, non-seulement les fourmis ont mieux discriminé ces odeurs qu'après un conditionnement absolu à l'une des deux odeurs, mais elles étaient également capables de discriminer des aldéhydes différant d'un seul carbone avec l'odeur utilisée comme SC+, ce dont elles n'ont pas été capables après un conditionnement absolu. Cependant, l'amélioration des capacités de discrimination ne s'est pas étendue à toutes les odeurs mais était observée pour les odeurs qui avaient une relation de chaîne carbonée au SC+, similaire à celle du SC-. En d'autres termes, quand la chaîne carbonée du SC- était plus *courte* que celle du SC+, une amélioration des capacités de discrimination était observée pour les odeurs ayant une chaîne carbonée plus *courte* que celle du SC+. A l'inverse, lorsque la chaîne carbonée du SC- était plus *longue* que celle du SC+, l'amélioration des capacités de discrimination était observée pour les odeurs ayant une chaîne carbonée plus *longue* que celle du SC+. Ces résultats semblent en accord avec les théories postulant qu'un apprentissage différentiel résulte d'une interaction entre les gradients d'excitation et d'inhibition respectivement sous-tendus par le SC+ et le SC-, ce que nous avons pu appuyer par une modélisation de ces différents gradients (**Chapitre II**).

La longueur de la chaîne carbonée ne serait pas la seule dimension pertinente pour la perception des odeurs puisque notre étude sur la perception des mélanges d'odeurs binaires a révélé que le phénomène d'*overshadowing* obéissait à des règles basées sur deux dimensions chimiques des molécules odorantes : la longueur de la chaîne carbonée et le groupe fonctionnel (**Chapitre III**). En effet, en étudiant la perception de mélanges binaires composés d'alcools et d'aldéhydes variant dans la longueur de la chaîne carbonée, nous avons pu montrer que les alcools masquaient les aldéhydes, que les chaînes carbonées longues masquaient les courtes mais que la combinaison de ces facteurs pouvaient s'annuler et supprimer l'*overshadowing*. Ainsi, nous avons pu montrer que l'*overshadowing* répond à des règles précises basées sur des propriétés des molécules odorantes qui ont déjà été montrées comme pertinentes pour la perception des odeurs chez les insectes et les vertébrés.

Des analyses complémentaires du contenu des composés des glandes mandibulaires, de la glande de Dufour et de la glande à poison (**Annexes II**), qui sont impliquées dans le recrutement ou l'alarme chez les fourmis, ont révélé qu'aucune des molécules odorantes utilisées dans cette thèse n'était contenue dans ces glandes. Par conséquent, nous pouvons supposer que la saillance particulière des alcools par rapport aux aldéhydes, par exemple, n'est pas due au fait que ces odeurs sont des substances semiochimiques produites chez les ouvrières *Camponotus aethiops*, ce qui aurait éventuellement pu expliquer leur pertinence particulière et le fait que les fourmis les perçoivent plus lorsqu'elles sont mélangées à d'autres odeurs. Ainsi, le phénomène d'*overshadowing* reposerait uniquement sur les propriétés intrinsèques du système olfactif de la fourmi. Les raisons, si elles existent, qui justifient que les différences de saillances au sein d'un mélange binaire soit déterminées par les propriétés chimiques des composants du mélange chez *Camponotus aethiops*, restent encore à déterminer.

Chapitre I

Sucrose responsiveness, learning success and task specialization in ants

Sucrose responsiveness, learning success and task specialization in ants

Margot Perez^{1, 2, 3}, Uther Rolland³, Martin Giurfa^{1, 2} and Patrizia d’Ettorre³

¹ Research Center on Animal Cognition; University of Toulouse; UPS; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

² Research Center on Animal Cognition; CNRS; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

³ Laboratory of Experimental and Comparative Ethology, University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, F-93430 Villetaneuse, France

* *Correspondence:* martin.giurfa@univ-tlse3.fr

Short title: Sucrose responsiveness and learning in ants



Published in Learn. Mem. 2013 20:417-420

Abstract

Social insects possess remarkable learning capabilities, which are crucial for their ecological success. They also exhibit interindividual differences in responsiveness to environmental stimuli, which underlie task specialization and division of labor. Here we investigated for the first time the relationships between sucrose responsiveness, behavioral specialization and appetitive olfactory learning in ants, including reproductive castes. We show that castes of the ant *Camponotus aethiops* differ in their responsiveness to sucrose and in their learning success in olfactory conditioning experiments in which sucrose is used as reward. Olfactory learning was better in foragers than in nurses, in agreement with their higher sucrose responsiveness. Interindividual variation in stimulus responsiveness and in learning may be, therefore, a crucial factor for division of labor in social insects.

Keywords

Learning; Sucrose Responsiveness; Division of Labor; Social Insects; Ants; *Camponotus aethiops*

Introduction

The capacity to learn and form robust memories about events in the environment is a distinctive trait of social insects (Giurfa 2007, 2013; Avarguès-Weber et al. 2011). It allows them to master changing environments and contributes to their ecological success. Social insects are mainly known through their sophisticated colonial organization, which relies on division of labor, the specialization of individuals in reproduction or in colony maintenance tasks such as brood care, foraging, nest defense or storage of food resources (Wilson 1971). Task specialization is typically ensured by individuals of different morphological castes and/or ages.

Different models have been proposed to explain division of labor and its relation to colony organization (Beshers and Fewell 2001). The response threshold model, which has been extremely influential in this framework, posits that individuals differ in their sensitivity, (and therefore in their responsiveness) to biologically relevant stimuli associated with specific tasks, thus leading to the emergence of division of labor (Robinson 1992; Bonabeau et al. 1996). Differential responsiveness to stimuli that act as positive (e.g. food) or negative (e.g. noxious events) reinforcements results also in variable learning performances, in which individuals learn better about reinforcements to which they are more sensitive (Scheiner et al. 2005).

These behavioral traits have been studied in the honeybee *Apis mellifera* where individual differences in sucrose responsiveness correlate with individual tendencies to forage either for pollen or nectar (Page et al 1998; Pankiw and Page 1999; Pankiw et al 2001; Scheiner et al 2003). Pollen foragers, for instance, are more responsive to a broad spectrum of sucrose concentrations than nectar foragers, which respond mainly to higher sucrose concentrations (Pankiw and Page 1999). In these experiments, sucrose responsiveness was

quantified by stimulating the antennae of restrained bees with increasing sucrose concentrations and determining if proboscis extension reflex (PER) occurred (Pankiw and Page 1999). Interindividual differences are established either via a sucrose response threshold (SRT), i.e. the sucrose concentration at which the response to sucrose differs from that to water (Page et al. 1998), or a sucrose response score (SRS), which is the total number of PER to a series of sucrose concentrations (Pankiw et al. 2001). Sucrose responsiveness not only correlates with the task performed by a bee but also with its learning success: the lower the SRT (i.e. the higher the SRS), the higher the bee's ability to learn in appetitive conditioning tasks (Scheiner et al 1999; 2001a, b; 2003; Scheiner and Arnold 2010). These correlations remain so far unique as the interplay between learning, reinforcement responsiveness and social organization has not been studied in any other social insect.

Ants constitute a remarkable example of eusocial lifestyle (Hölldobler and Wilson 1990). Despite their sophisticated social organization and division of labor, little is known about the determinants of these specializations. Responses to food are flexible and may change among individuals in several ant species (e.g. Josens et al. 1998; Falibene et al. 2009; Schilman 2011). Interindividual differences in sucrose responsiveness were found in immobilized workers of various ant species, which were stimulated with different concentrations of sucrose solution (Falibene and Josens 2012). The possible relationship between these differences, learning success and behavioral specializations within the colony remains, however, unknown. Yet, relating these variables is possible because, besides the possibility of testing sucrose responsiveness, controlled learning protocols have been recently established for ants (Dupuy et al. 2006; Guerrieri and d'Ettorre 2010; Guerrieri et al. 2011).

Here we provide the first comprehensive study investigating the interplay between learning success, sucrose responsiveness and task specialization in ants. We focused on the carpenter ant *Camponotus aethiops*, which feeds to some extent on nectar (mostly from extra-floral nectaries); this species can also be subjected to appetitive olfactory conditioning in harnessing conditions in the laboratory (Guerrieri and d’Ettorre 2010). We determined whether different castes differ in their SRS and analyzed how SRS levels relate to task specialization. We further studied if nurses and foragers differ in appetitive olfactory learning and if these differences relate to their respective SRS levels.

Material and methods

Nine queenright colonies of *Camponotus aethiops* were collected at Pompertuzat (Midi-Pyrénées, France: latitude 43.5°, longitude 1.516667°) and kept in the laboratory (24°C, 12L:12D cycle, 60% humidity), each in two Fluon® coated plastic boxes connected by a plastic hose. One box was provided with plaster floor and covered by cardboard (nest); the other was exposed to light (foraging arena). Colonies were deprived of sucrose three wk before the experiments. Mealworms and water were provided *ad libitum*.

For the experiments, each ant was immobilized by cooling it on ice for 10 min and then harnessed in a holder (Eppendorf® of 0.2 ml for workers and males and 1.5 ml for gynes from which the tip was removed). The ant’s head was then passed through the apical hole and strips of adhesive tape were placed between the head and the thorax to prevent body movements except those of the antennae and mouthparts (Supplemental Fig. S1) (Guerrieri & d’Ettorre 2010). Ants were then kept in a humid box during 3 h for recovery and habituation to the harness.

Individual responsiveness scores were quantified via the *maxilla-labium* extension response [MaLER; (Guerrieri and d'Ettorre 2010)] upon stimulation with a series of linear logarithmic ascending concentrations of sucrose solution (0.1, 0.3, 1, 3, 10 and 30% w/w) (Page et al. 1998). Each stimulation lasted 2s. Prior to each sucrose stimulation water was delivered to control for sensitization or habituation to increasing sucrose concentration. Groups of 15 ants were tested, one ant at a time, with an interstimulus interval of 7 min. A 10-sec interval was established before and after stimulus presentation to avoid contextual effects. MaLER was scored as 1 when visible, 0 otherwise. Individuals that did not respond to concentrations that were higher than those eliciting prior to responding were discarded (~7 % of ants in both experiments). Individual sucrose and water responsiveness scores (SRS and WRS, respectively), were quantified as the sum of the ant's response to either stimulus. These scores varied between 0 (no response at any sucrose/water stimulation) and 6 (response to all sucrose/water stimulations) (Scheiner et al. 2003).

In Experiment 1, we compared the sucrose responsiveness of five castes performing different tasks: gynes, males, nurses, inactive workers and foragers. Gynes and males were collected from three colonies 2 wk after they showed activity in the foraging arena; minor workers were collected from two different colonies and assigned to one of three behavioral castes (marked with different color paint) after two wk of behavioral observations (1 h, twice a day): foragers, if they collected food or water; nurses, if they were involved in brood care, or "inactive", if they displayed reduced locomotor activity and a distended (full) abdomen at the beginning of sucrose deprivation. The SRS of each caste was then determined (for workers, assays were performed blind with respect to individual behavioral task).

In Experiment 2, nurses and foragers were tested for their SRS and then subjected to a differential conditioning procedure with two odors, a rewarding one and a non-rewarding

one. Nurses and foragers were collected from four colonies and their SRTs were determined. Individuals that responded to the highest sucrose concentration assay (30%) were used 1h later for differential conditioning experiments in which the unconditioned stimulus (US) was 30% sucrose solution. We trained ants to respond with MaLER to a CS+ odor paired with the US and not to a CS- odor that was not paired with the US. Octanal and hexanol (floral scents; Sigma Aldrich) were used as CS+ and CS- in a balanced way. Six μ l of pure odorant were applied onto a piece of filter paper that was inserted in a plastic 10-ml syringe. Ants responding to the first presentation of the CS+ or the CS- were discarded. The acquisition phase consisted of 12 trials (6 CS+ presentations and 6 CS- presentations in pseudo-random order, i.e. no more than two trials of the same CS type were allowed; Guerrieri and d'Ettorre 2010). Each trial lasted 1 min. In CS+ trials, odor stimulation lasted 5 sec and anticipated sucrose stimulation by 3 sec, which also lasted 5 sec. In CS- trials, only the 5-sec odorant stimulation was delivered. In both cases, 25 sec and 30 sec elapsed before and after stimulus delivery, respectively. Intertrial interval was 10 min. An air extractor was placed behind the ant to remove undesired odorant stimulations. Only individuals that responded at least five times to the US were included in the statistical analyses. Individual acquisition scores to CS+ (AS+) and CS- (AS-) were calculated as the sum of an ant's conditioned responses (CR) to CS+ and CS-, respectively. These scores vary between 0 (no CR to CS+/CS-) and 5 (CR to CS+/CS- in trials 2-6).

Statistical analyses were performed with R environment (version 2.15.0 <http://www.R-project.org/>). Two-tailed Kruskal-Wallis tests were used to test variation in SRS and WRS between worker and sexual castes (package `pgirmess`; see CRAN.R-project.org/package=pgirmess). Multiple Wilcoxon-Mann-Whitney rank sum tests were applied for pairwise comparisons between castes (with sequential Bonferroni corrections)

and for testing differences in SRS, WRS, AS+, AS- between nurses and foragers. Spearman rank correlation test was used to study correlations between SRS and AS+ (Rcorr function, package Hmisc; <http://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>). For further details about statistics see Supplemental materials.

Results

In Experiment 1, sucrose (SRS) and water responsiveness scores (WRS) differed significantly between castes (Fig 1a, SRS: Kruskal-Wallis, $\chi^2=69.58$, $df=4$; $p<0.001$; Fig 1b, WRS: $\chi^2=57.21$, $df=4$; $p<0.001$; see Supplemental Fig. S2, for sucrose and water responsiveness curves).

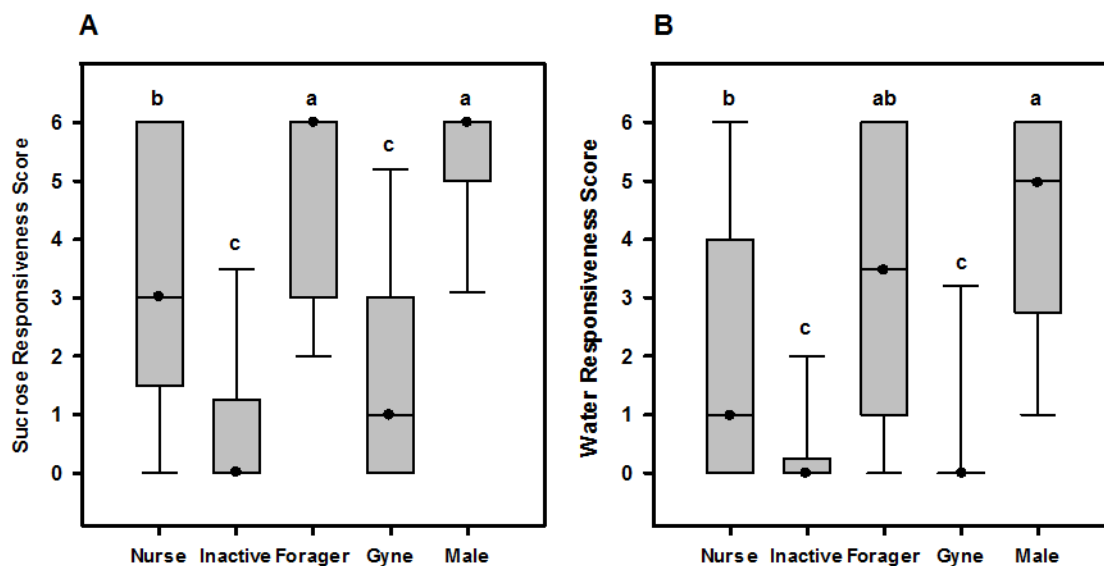


Figure 1: Sucrose and water responsiveness scores of the five castes: A) Box plots of sucrose responsiveness score of *nurses* (n=37), *inactive workers* (n=34), *foragers* (n=44), *gyenes* (n=23) and *males* (n=26), **B)** boxplot of water responsiveness scores of the same individuals. SRS and WRS vary between 0 (no response to sucrose/water stimulation) and 6 (response to all 6 stimulations); boxes show median (line and dot), 1st and 3rd quartiles, 5th and 95th percentiles (whiskers). Groups that are statistically different have different letters.

Although foragers and males exhibited higher SRS and WRS values, inactive workers and gynes showed lower SRS and WRS values. Nurses showed intermediate SRS values and WRS values similar to those of foragers (Table 1).

Caste 1	Caste 2	SRS (adjusted p-value)	WRS (adjusted p-value)
Foragers	Nurses	< 0.05	0.052
	Inactive workers	<0.001	<0.001
	Gynes	<0.001	<0.001
	Males	NS	NS
Nurses	Inactive workers	<0.001	<0.05
	Gynes	<0.01	<0.05
	Males	<0.01	<0.001
Inactive workers	Gynes	NS	NS
	Males	<0.001	<0.001
Gynes	Males	<0.001	<0.001

Table 1: Comparison of SRS and WRS between castes. Adjusted p-values correspond to pairwise comparisons of scores between each caste (sequential Bonferroni corrections after multiple Wilcoxon-Mann-Whitney rank sum tests); NS not significant.

In Experiment 2, we quantified sucrose responsiveness of nurses and foragers (Supplemental Fig. S3) and kept only those ants (83.87% and 50.81%, respectively, of foragers and nurses assayed) that responded to the highest sucrose concentration (30%), used as US in the subsequent conditioning procedure. As in the previous experiment, SRS values were significantly higher in foragers than in nurses but WRS values were not statistically different (*SRS*: Wilcoxon-Mann-Whitney rank sum test, $W=890.5$, $p<0.05$; *WRS*: $W=1028.5$, $p=0.25$).

Both castes learned the discrimination between rewarded and unrewarded odors (see Supplemental Fig. S4 for learning curves), but foragers learned the olfactory

discrimination better than nurses. Indeed, foragers exhibited higher AS+ values than nurses ($W=888$, $p<0.05$)(Fig. 2), although AS- values did not differ ($W=1077.5$, $p=0.31$). Thus, AS+ values are a reliable indicator of individual learning success. AS+ values were positively correlated with SRS values for nurses ($n=35$; $r_s=0.62$; $p<0.0001$) and approached significance for foragers ($n=68$; $r_s=0.23$; $p=0.055$). AS- values also correlated positively with SRS values both for nurses ($n=35$; $r_s=0.54$; $p<0.0001$) and foragers ($n=68$; $r_s=0.28$; $p=0.05$), thus indicating that the excitatory strength from the CS+ generalized in part to the CS-.

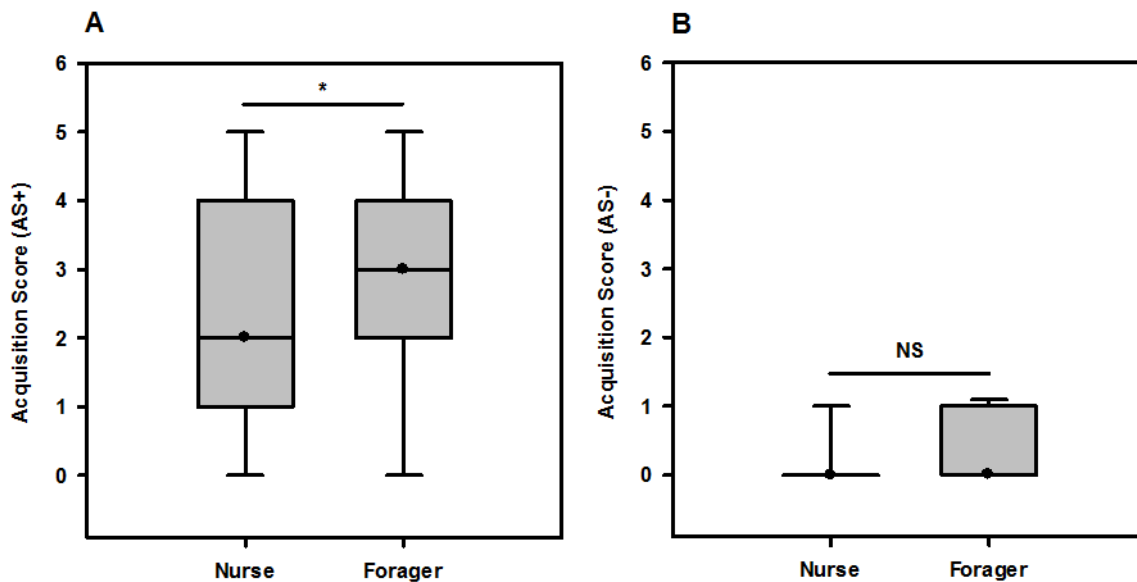


Figure 2: Learning success of nurses and foragers: Box plots of acquisition score to **A)** CS+ (AS+) and **B)** CS- (AS-) of *nurses* ($n=35$) and *foragers* ($n=68$). AS+ and AS- vary between 0 (no response to CS+ and CS-, respectively, during all successive trials) and 5 (positive responses to CS+ and CS-, respectively, after the first trial); boxes show median (line and dot), 1st and 3rd quartiles, 5th and 95th percentiles (whiskers). * $P < 0.05$.

Discussion

Our results show for the first time that different castes of an ant species exhibit a significant variation in their sucrose responsiveness, which is ecologically relevant since these ants feed on extra-floral nectaries. This inter-caste variation in sucrose response scores (SRS) found in *C. aethiops* is in line with the response threshold model of division of labor (Beshers and Fewell 2001): foragers, for instance, proved to be highly sensitive both to sucrose (high SRS) and to water (high WRS). Higher WRS and SRS endow ants with the capacity to collect water and to sample food sources of variable quality, thus increasing information gathering about potential food sources. Inactive workers, in contrast, exhibited low WRS and SRS as they did not practically respond to water and responded only to the highest sucrose concentrations. This high selectivity for sucrose is adaptive in a scenario in which inactive workers serve as sucrose storers for the colony. The low SRS found in these ants could relate to the fact that crop filling induces a decrease in sucrose responsiveness (Falibene and Josens 2012). Nurses, which are younger than foragers and inactive workers (Hölldobler and Wilson 1990), responded to intermediate sucrose concentrations. They could, therefore, modulate their responsiveness and specialize in different tasks as they age. Gynes responded only to highest sucrose concentrations probably because they need to store energy for solitary colony founding and egg-laying. By contrast, males, which die quickly after swarming and do not need to store energy, may afford high responsiveness to water and low sucrose concentrations. This scenario thus proposes that both sucrose and water responsiveness are adaptive traits related to the specific biological constraints of each caste. Variations in water responsiveness would reflect such biological differences and a general state of responsiveness to appetitive stimuli rather than being the mere result of sucrose sensitization.

The superior learning performance of foragers compared to that of nurses is relevant for quickly acquiring local environmental cues (e.g. olfactory ones) predicting food, thus increasing foraging efficiency. Their higher level of acquisition likely results from their higher responsiveness to sucrose reward (i.e. their high SRS), similarly to honeybees, where pollen foragers show better acquisition performances than nectar foragers due to their higher responsiveness to sucrose (Scheiner et al. 2005).

The picture emerging from these experiments is one in which castes within an ant colony differ in terms of their responsiveness to food reward and therefore in their learning capabilities in conditioning experiments in which this food reward is used as US. Although learning was only evaluated in foragers and nurses, the sucrose scores found for the other castes allow predicting their learning success. Males, like foragers, had higher SRS and are thus expected to have a learning success as high as that of foragers. Inactive workers and gynes, which showed SRS lower than those of nurses, should be the less efficient learners.

In conclusion, *Camponotus aethiops* exhibit interindividual variability in sucrose and water responsiveness, thereby supporting the response threshold model of division of labor. Differences in appetitive learning are thus likely mediated by sucrose responsiveness and relate to behavioral tasks.

Acknowledgments

Thanks are due to A. Dussutour and S. Teseo for comments on previous versions of the manuscript and H. Rödel for help with statistical analyses. MG was supported by the Institut Universitaire de France, the French Research Council (CNRS) and the University Paul Sabatier and PdE by a Marie Curie Reintegration Grant. This work was supported by the CNRS research network GDR 2822 Ethologie.

References

- Avarguès-Weber A, Deisig N, Giurfa M. 2011. Visual cognition in social insects. *Annu Rev Entomol* **56**: 423-443.
- Beshers SN, Fewell JH. 2001. Models of division of labor in social insects. *Annu Rev Entomol* **46**: 413–40.
- Bonabeau E, Theraulaz G, Deneubourg JL. 1996. Quantitative study of the fixed threshold model for the regulation of division of labour in insect societies. *Proc R Soc B* **263**: 1565-1569.
- Dupuy F, Sandoz J-C, Giurfa M, Josens R. 2006. Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Anim Behav* **72**: 1081-1091.
- Falibene A, de Figueiredo Gontijo A, Josens R. 2009. Sucking pump activity in feeding behavior regulation in carpenter ants. *J Insect Physiol* **55**: 518–524.
- Falibene A, Josens R. 2012. Sucrose acceptance threshold: a way to measure sugar perception in ants. *Insect Soc* **59**: 75–80.
- Giurfa M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J Comp Physiol A* **193**: 801-824.
- Giurfa M. 2013. Cognition with few neurons: higher-order learning in insects. *Trends Neurosci* Epub ahead of print.
- Giraudoux P. 2010. pgirmess: Data analysis in ecology. R package version 1.4.5. <http://CRAN.R-project.org/package=pgirmess>
- Guerrieri FJ, d’Ettorre P. 2010. Associative learning in ants: Conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *J Insect Physiol* **56**: 88-92.
- Guerrieri FJ, d’Ettorre P, Devaud J-M, Giurfa M. 2011. Long-term olfactory memories are stabilized via protein synthesis in *Camponotus fellah* ants. *J Exp Biol* **214**: 3300–3304.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. *The Ants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Josens R, Farina WM, Roces F. 1998. Nectar feeding by the ant *Camponotus mus*: intake rate and crop filling as a function of sucrose concentration. *J Insect Physiol* **44**: 579– 585.

- Page Jr RE., Erber J, Fondrk MK. 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.) *J Comp Physiol A* **182**: 489–500.
- Pankiw T, Page RE Jr. 1999. The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* **185**: 207-213.
- Pankiw T, Waddington K, Page Jr RE. 2001. Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. *J Comp Physiol A* **187**: 293-301.
- Robinson GE. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol* **37**: 637–665
- Scheiner R, Erber J, Page Jr RE. 1999. Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* **185**: 1-10.
- Scheiner R, Page Jr RE, Erber J. 2001a. Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behav Brain Res* **120**: 67-73.
- Scheiner R, Page Jr RE, Erber J. 2001b. The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem* **76**: 138-150.
- Scheiner R, Barnert M, Erber J. 2003. Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidologie* **34**: 67-72.
- Scheiner R, Kuritz-Kaiser A, Menzel R, Erber J. 2005. Sensory responsiveness and the effects of equal subjective rewards on tactile learning and memory of honeybees. *Learn Mem* **12**: 626-635.
- Scheiner R, Arnold G. 2010. Effects of patriline on gustatory responsiveness and olfactory learning in honey bees. *Apidologie* **41**: 29-37.
- Schilman PE. 2011. Trail-laying behavior as a function of resource quality in the ant *Camponotus rufipes*. *Psyche*
- Wilson EO. 1971. *The insect societies*. Harvard University Press, Cambridge

Supplemental material

Statistical analyses for sucrose responsiveness and acquisition curves

Sucrose and water response scores, and acquisition data were analysed with R-2.15.0 (R Development Core Team, 2012). We applied generalized linear mixed models (GLMM, using the package lme4; Bates *et al.* 2011) with a binomial error structure (logit-link). The ant's response was used as response variable and was scored as 1 if the MaLER was visible upon stimulation and 0 otherwise.

Preliminary analyses on all castes (five and two castes respectively for Experiments 1 and 2) showed a significant colony effect when colony of origin was included in the model as fixed factor (Experiment 1: $\chi^2=24.32$, $df=4$, $p<0.001$; Experiment 2: $\chi^2=23.05$, $df=3$, $p<0.001$). Because this effect was not the focus of our study, we adjust for colony origin by including this factor in our models as a random factor. For analysing sucrose responsiveness curves for each caste, sucrose concentration was used as predictor variable (covariate), the type of stimulus (sucrose or water) as fixed factor and individuals and colony of origin as random factors in order to allow for repeated measurements and adjust for colony origin. Interactions between sucrose concentration and stimulus were included to detect differences in slopes along the stimulations for the two types of stimuli.

For analysing acquisition phase for each caste, trial was used as covariate, stimulus (CS+ and CS-) and the nature of the CS+ (hexanol or octanal) as fixed factors. For the same reasons mentioned above, individuals and colony of origin were included as random factors (the colony effect approached to significance when included as fixed factor (for both castes, $\chi^2=7.48$, $df=3$, $p=0.06$)). Interactions between trial, stimulus and nature of the stimulus were included in the model to detect differences in slopes along the trials for the two types of CS and for the floral scents used.

Non-significant interactions were reduced from the models and the models were then recalculated.

Experiment 1: SRS and division of labour

We found significant interactions between stimulus type (water and sucrose) and sucrose concentration (Supplementary figure S2; GLMM, *foragers*: $\chi^2=22.65$, $df=1$, $p<0.001$; *nurses*: $\chi^2=20.16$, $df=1$, $p<0.001$; *inactive workers*: $\chi^2=11.41$, $df=1$, $p<0.001$, *gynes*: $\chi^2=5.33$, $df=1$, $p<0.05$ and *males*: $\chi^2=5.79$, $df=1$, $p<0.05$), thus indicating that responses to sucrose and water differed over successive sucrose stimulations of increasing concentration. Only inactive workers exhibited different responses to the stimulus “sucrose” and “water”, irrespective of sucrose concentration (*inactive workers*: $\chi^2=5.58$, $df=1$, $p<0.05$; *foragers*: $\chi^2=0.52$, $df=1$, $p=0.47$; *nurses*: $\chi^2=1.06$, $df=1$, $p=0.31$; *gynes*: $\chi^2=0$, $df=1$, $p=1$; *males*: $\chi^2=0.19$, $df=1$, $p=0.66$). For all five castes, responsiveness to sucrose and water were modified by increasing concentrations of sucrose solution (*foragers*, $\chi^2=47.98$, $df=1$, $p<0.001$; *nurses*, $\chi^2=49.91$, $df=1$, $p<0.001$; *inactive workers*, $\chi^2=18.72$, $df=1$, $p<0.001$; *gynes*: $\chi^2=27.11$, $df=1$, $p<0.001$; *males*: $\chi^2=15.23$, $df=1$, $p<0.001$). Moreover, ants significantly augmented their response to sucrose solutions of increasing concentration (*foragers*: $\chi^2=21.54$, $df=1$, $p<0.001$; *nurses*: $\chi^2=18.59$, $df=1$, $p<0.001$; *inactive workers*: $\chi^2=12.74$, $df=1$, $p<0.001$; *gynes*: $\chi^2=7.06$, $df=1$, $p<0.01$; *males*: $\chi^2=4.24$, $df=1$, $p<0.05$), i.e. the higher the sucrose concentration, the higher the percentage of ants responding to it. Unlike the other castes, foragers and males also increased their responses to water (*foragers*: $\chi^2=7.39$, $df=1$, $p<0.01$; *males*: $\chi^2=9.25$, $df=1$, $p<0.01$; *nurses*: $\chi^2=3.20$, $df=1$, $p=0.07$; *inactive workers*: $\chi^2=0.001$, $df=1$, $p=0.97$; *gynes*: $\chi^2=3.50$, $df=1$, $p=0.06$), thus indicating that ants in these castes were probably partially sensitized by sucrose stimulation of increasing concentrations.

Experiment 2: SRS and learning success

As observed in the previous experiment, there was a significant interaction between stimulus type and sucrose concentration for both foragers and nurses (Supplementary figure S3; *nurses*: $\chi^2=54.79$, $df=1$, $p<0.001$; *foragers*: $\chi^2=52.46$, $df=1$, $p<0.001$) so that responses to sucrose and water differed over successive sucrose stimulations of increasing concentration. Responses to sucrose and water were significantly different, irrespective of sucrose concentration considered (*nurses*: $\chi^2=24.73$, $df=1$, $p<0.001$; *foragers*: $\chi^2=4.78$, $df=1$, $p<0.05$). Responsiveness to sucrose and water were influenced by increasing sucrose concentration

(*nurses*: $\chi^2=126.25$, $df=1$, $p<0.001$; *foragers*: $\chi^2=139.14$, $df=1$, $p<0.001$). More precisely, ants significantly increased both their sucrose responsiveness (*nurses*: $\chi^2=66.22$, $df=1$, $p<0.001$; *foragers*: $\chi^2=30.71$, $df=1$, $p<0.001$) and their water responsiveness with increasing sucrose concentrations (*nurses*: $\chi^2=4.71$, $df=1$, $p<0.05$; *foragers*: $\chi^2=16.05$, $df=1$, $p<0.001$), thus showing a sensitization effect induced by sucrose stimulations. As in the previous experiment, SRS and WRS values differed significantly between nurses and foragers (SRS: Mann-Witney, $W=2855$, $p<0.001$; WRS: $W=3726$, $p<0.001$).

During acquisition, nurses and foragers conditioned either with hexanol or with octanal as CS+ did not differ significantly (*nurses*: $\chi^2=0.49$, $df=1$, $p=0.48$; *foragers*: $\chi^2=0.72$, $df=1$, $p=0.40$) so that data for both odorants were pooled for nurses and for foragers (Supplementary figure S4). We found a significant interaction between trials and CS (*nurses*: $\chi^2=11.93$, $df=1$, $p<0.001$; *foragers*: $\chi^2=21.31$, $df=1$, $p<0.001$), thus indicating that ants learned to discriminate the rewarded odor from the unrewarded odor during successive trials. The simple CS effect was not significant for both castes (*nurses*: $\chi^2=0.08$, $df=1$, $p=0.77$; *foragers*: $\chi^2=1.09$, $df=1$, $p=0.30$), showing that the differential response to CS+ and CS- resulted from the successive learning trials. Responses to the CS+ and the CS- changed during successive trials for foragers but not for nurses (*nurses*: $\chi^2=1.42$, $df=1$, $p=0.23$; *foragers*: $\chi^2=9.88$, $df=1$, $p<0.01$). Specifically, both castes increased significantly their response to the CS+ along successive trials (*nurses*: $\chi^2=49.88$, $df=1$, $p<0.001$; *foragers*: $\chi^2=121.60$, $df=1$, $p<0.001$) but differed in how they did respond to the CS- as foragers, but not nurses, increased their responses to the CS- during successive trials (*nurses*: $\chi^2=1.14$, $df=1$, $p=0.29$; *foragers*: $\chi^2=129.25$, $df=1$, $p<0.001$).

References

- Bates DM, Maechler M, Bolker B. 2011. *lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and R package version 0.999375-39*. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Guerrieri FJ, d'Ettorre P. 2010. Associative learning in ants: Conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *J Insect Physiol* **56**: 88-92.

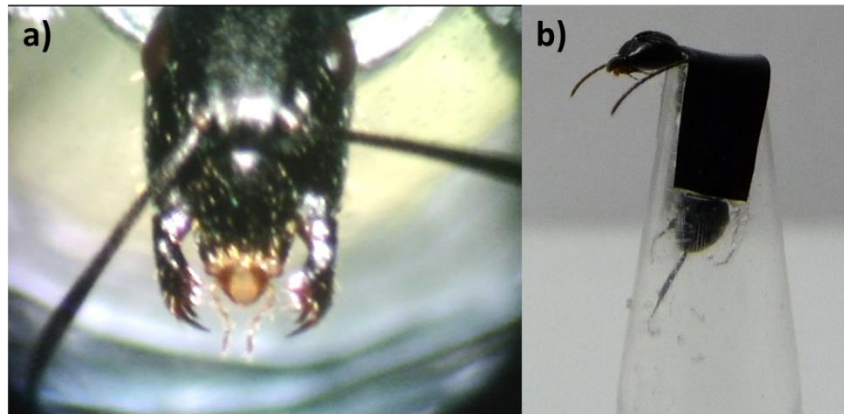


Figure S1: *Maxilla-labium* extension response (MaLER) in a harnessed *C. aethiops* worker.

a) The maxilla-labium extension response (MaLER) upon sucrose stimulation of the antennae; **b)** Harnessed ant in an individual holder (Eppendorf® of 0.2 ml with the tip removed); a strip of adhesive tape is placed between the head and the thorax so that the ant can only move its antennae and mouthparts.

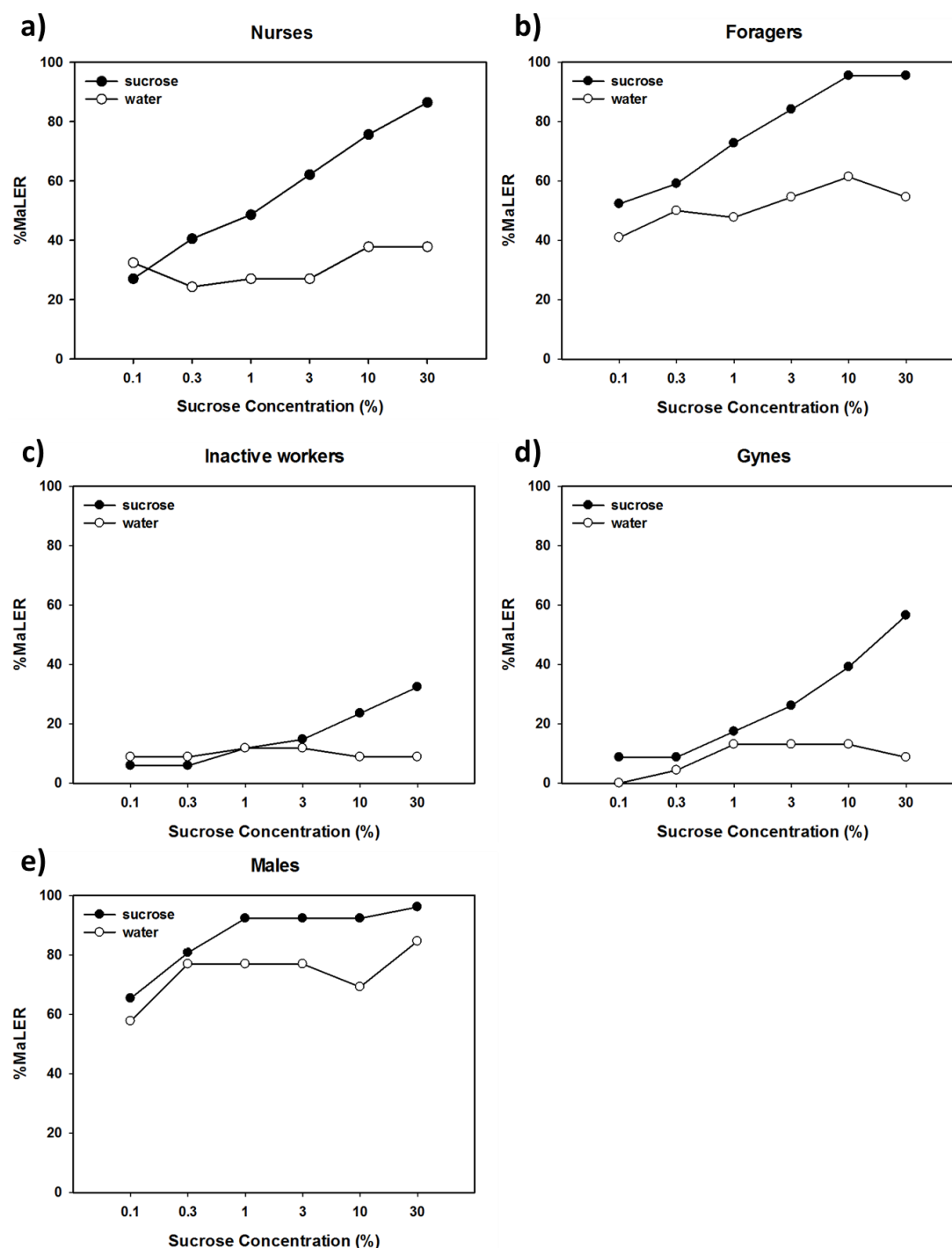


Figure S2: Sucrose and water responsiveness of the five castes: a) nurses (n=37), b) inactive workers (n=34), c) foragers (n=44), d) gynes (n=23) and e) males (n=26). a-e) Black circles represent the proportion of ants responding with MaLER to increasing concentrations of sucrose solution; white circles represent the proportion of MaLER for the same ants stimulated with water (control stimulation). The proportion of ants showing MaLER is higher to sucrose than to water during successive trials and when sucrose concentration increases (for more details about statistics see Supplementary Results).

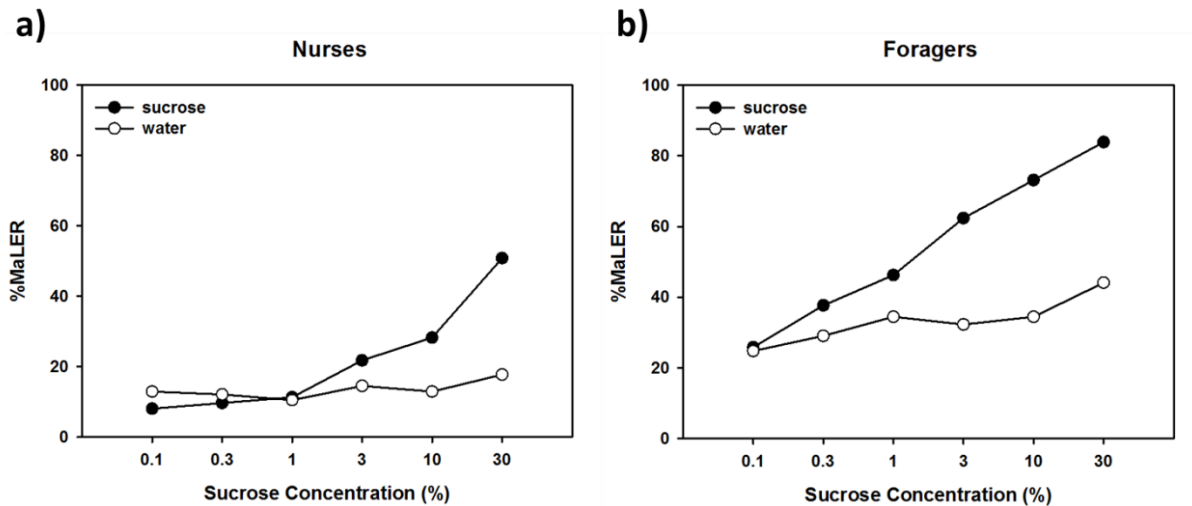


Figure S3: Sucrose and water responsiveness of nurses and foragers: a) nurses (n=124), **b)** foragers (n=93). **a-b)** Black circles represent the proportion of ants showing MaLER for sucrose stimulation of increasing concentration; white circles represent the proportion of MaLER for the same ants when presenting water (control stimulation). The proportion of MaLER is higher when presenting sucrose rather than water over successive trials and when the concentration increases (for more details about statistics see Supplementary Results).

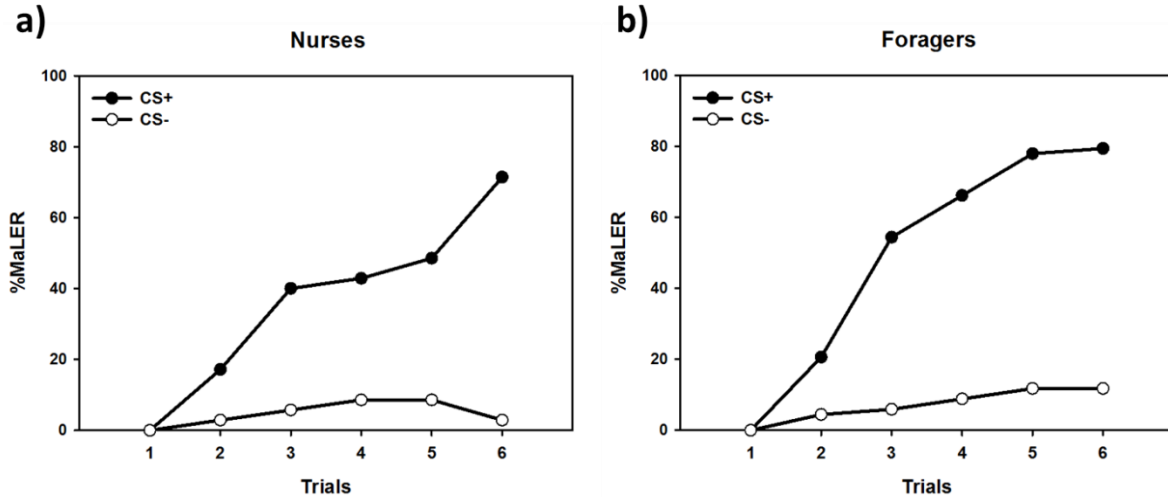


Figure S4: Differential appetitive olfactory conditioning of MaLER in workers responding to 30%: a) nurses (n=35) **b)** foragers (n=68). **a-b)** Black circles: proportion of ants showing MaLER to the CS+ during 6 successive trials (paired presentation of CS and sucrose); white circles: proportion of ants showing MaLER to the CS- during 6 successive trials. Ants learned to differentiate between rewarded and unrewarded odors as a result of conditioning (for more details about statistics see Supplementary Results).

Chapitre II

**Olfactory similarity relationships change
with the conditioning procedure in ants**

Olfactory similarity relationships change with the conditioning procedure in ants

Margot Perez^{1,2,3}, Patrizia d’Ettorre¹, Thomas Nowotny⁴ and Martin Giurfa^{2,3*}

¹ Laboratory of Experimental and Comparative Ethology (LEEC), University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France

² Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Research Center on Animal Cognition (UMR5169), Toulouse, France

³ University Paul-Sabatier, Research Center on Animal Cognition (UMR5169), Toulouse, France

⁴ Center for Computational Neuroscience and Robotics, School of Engineering and Informatics, University of Sussex, Brighton, UK

* Correspondence: martin.giurfa@univ-tlse3.fr

Manuscript in preparation

Abstract

Perceptual similarity between stimuli is often assessed by testing animal response to different stimuli after training them to either absolute (one stimulus is reinforced) or differential conditioning (one stimulus is reinforced and a second stimulus is explicitly not reinforced or punished). However, studies on how conditioning procedures affect perceptual similarity remain scarce. Here, we investigated the influence of the conditioning procedure on odor discrimination in ants, for which olfaction plays a central role in many aspects of their natural behaviors. In absolute conditioning, ants were rewarded with sucrose on a single odor (aldehyde); in differential conditioning, ants were trained individually with the same odor but another odor (an aldehyde differing in two carbon atoms from the rewarded one) was punished with quinine. Ants were then tested with aldehydes differing in carbon-chain length, including the trained odor(s). We show that carbon-chain length is a relevant dimension for graded olfactory similarity in ants and that differential conditioning enhances discriminatory abilities along this dimension. The improved olfactory discrimination displayed by ants would rely on the interaction of excitatory and inhibitory generalization gradients mediated respectively by the rewarded and the punished odors, as suggested by generalization gradients modelling. Our study therefore reveals that olfactory similarity relationships are not immutable but are shaped by the individual's olfactory experience.

Introduction

Animals can respond innately to some stimuli (e.g., avoid a predator odor) or can associate stimuli with their ecological meaning (e.g., associate the odor, color or shape of a flower with the nectar reward that it provides), which allows making predictions about their environment and adjusting their behavior. The capacity to associate stimuli with different outcomes and to differentiate these stimuli from similar but irrelevant ones is essential for feeding, mating and communication in general. Discrimination abilities (i.e. treating different stimuli as distinct) displayed by most living animals are therefore critical for their survival and reproductive success. However, in an environment that is continuously changing, treating differentially all the different stimuli would not be necessarily advantageous. For instance, the quantity or the quality of volatiles emitted by a flower can vary slightly within time and space (Dudareva et al., 2004) without necessarily signifying a difference in nectar quality. Moreover, similar stimuli often share similar outcomes. Therefore, most living animals display also generalization abilities, i.e. treating different but similar stimuli as equivalent (Pavlov, 1927; Shepard, 1987; Ghirlanda and Enquist, 2003), to cope with stimulus variations or stimulus novelty.

The degree of generalization across stimuli is determined by the degree of similarity between the stimuli along the perceptual dimension(s) to which they differ (Shepard, 1987; Ghirlanda and Enquist, 2003). Thus, a generalization gradient can be drawn by training animals to respond to a particular stimulus and then by testing the animals' responses to several stimuli that vary along the same dimension(s) than the trained one. This generalization gradient shows that the more similar the stimuli, the higher the number of animals responding to them, and therefore the higher the generalization (Guttman and Kalish, 1956; Ghirlanda and Enquist, 2003). Generalization gradients are useful to understand how animals perceive and process the stimuli that they encounter in their environment since perceptual similarity relies in part on the properties of the perceiver's sensory system. For instance, in the olfactory modality, carbon-chain length of odors sharing the same functional group has been shown to be a relevant dimension as it represents an axis for graded odorant similarity in many taxa (vertebrates: Laska and Freyer, 1997; Laska and Teubner, 1998, 1999; Laska et al., 1999b; Linster and Hasselmo, 1999; Laska and Hübener, 2001; Cleland et al., 2002; invertebrates: Laska et al., 1999; Guerrieri et al., 2005;

Daly et al., 2001); i.e. the lower the difference in carbon-chain length between odors, the stronger the generalization. By illustrating the relevance of carbon-chain length in perceptual similarity, these studies have significantly contributed to the understanding of which odor properties affect odor perception and therefore how odors are processed by the animal's olfactory system (e.g. Linster and Hasselmo, 1999; Guerrieri et al., 2005).

Perceptual similarity does not only rely on the intrinsic properties of the perceiver's sensory system but is also subjected to the perceiver's experience. Indeed, discrimination abilities between similar stimuli can be improved by differential learning, which consists in the parallel association of one stimulus (the conditioned stimulus, CS+) with a reward (the unconditioned stimulus, US+) and of another stimulus (CS-) with an absence of reward or a punishment (US-). The ability to shift from generalization to discrimination between similar stimuli depending on appropriate experience has been shown in many species and in diverse sensory modality such as vision and olfaction (Hanson, 1959; Giurfa, 2004; Dyer and Chittka, 2004; Cleland et al., 2002; Linster et al., 2002; Chapuis and Wilson, 2012; Chen et al., 2011; Li et al., 2008; Mishra et al., 2010; Barth et al., 2014). The comparison of generalization gradients obtained either after training to one stimulus (i.e. absolute conditioning) or after training to discriminate two stimuli (i.e. differential conditioning) is therefore useful to understand how the animal's experience shapes the similarity relationships of the stimuli and therefore to which extent the sensory system is plastic.

Despite the extensive use of insects as behavioral and neurophysiological models for the study of olfactory perception and learning (Smith and Getz, 1994; Martin et al., 2011), the influence of experience on odor perception in adult insects has been, to our knowledge, poorly investigated (Daly et al., 2001; Barth et al., 2014). Moreover, the low number of odors used or the lack of systematic analyses makes difficult to establish consistent effects of experience in the insect's olfactory modality. Ants rely heavily on olfactory cues in their natural environment and in social interactions (Hölldobler and Wilson, 1990), therefore they represent suitable model for the study of olfactory perception and learning (Dupuy et al., 2006; van Wilgenburg et al., 2012; Bos et al., 2012, 2013; Zube et al., 2008; Dupuy et al., 2010). Furthermore, controlled olfactory conditioning protocols have been established for ants, allowing to train them either in absolute or differential conditioning (Dupuy et al., 2006; Josens et al., 2009; Guerrieri and d'Ettorre, 2010; van Wilgenburg et al., 2012; Bos et

al., 2012, 2013; Perez et al., 2013). Olfactory generalization has been recently explored in ants (Bos et al., 2012, 2013), showing that carbon-chain length is important for olfactory perceptual similarity. Both absolute and differential conditioning have been used to investigate of how ants perceive odors (Dupuy et al., 2006; van Wilgenburg et al., 2012; Bos et al., 2012, 2013), but the specific influence of experimental procedure, and therefore of ants' olfactory experience, on perceptual similarity has never been investigated. In the present study, we therefore asked whether olfactory experience shapes the olfactory similarity relationships in the ant *Camponotus aethiops*.

Material and methods

Study organism

Six queenright colonies of *Camponotus aethiops* were collected in May 2012 and April 2013 at Pompertuzat (Midi-Pyrénées, France, latitude 43.5°, longitude 1.516667°) and kept in the laboratory (25°C, light-dark cycle= 12:12, 60% humidity) in artificial nests composed by two plastic boxes connected by a plastic hose. One of the boxes was covered by cardboard and contained a plaster floor to form the nest; the other box, exposed to light, was the foraging arena. The inner sides of the two boxes were coated with Fluon® to prevent ants from escaping. Ants were fed twice a week with carbohydrate, protein and vitamin (Bhatkar and Whitcomb, 1970); water was provided ad libitum. Three weeks prior the onset of the experiment, the ants were deprived of sucrose to increase their motivation for sucrose reward during conditioning but *Tenebrio molitor* mealworm (protein) and water were provided ad libitum.

Handling

Medium sized workers collected in the foraging arena were kept in glass vials and cooled on ice for 10 min until they stopped moving. Each ant was harnessed in an individual holder consisting of a 0.2 ml Eppendorf® tube from which the tip was removed. The ant's head was passed through the apical hole and a strip of adhesive tape was placed between the head and the thorax preventing body movement but allowing free movements of antennae and

mouthparts (Guerrieri and d’Ettorre, 2010). Ants were then left in a quiet and humid place for 3 h to recover from anesthesia and habituate to harnessing conditions.

Stimuli

Four aldehydes that varied in carbon-chain length from 6 to 9 carbons (i.e. hexanal, heptanal, octanal and nonanal; Sigma Aldrich, France) were used as conditioned (CS) and test stimuli. These odors are part of floral blends (Knudsen et al., 2006) and that are thus relevant for *Camponotus aethiops*, which forages partly on extra-floral nectaries. Before each training phase, two microliters of pure odorant were applied onto a 1cm² piece of filter paper, which was then inserted in a plastic 10 ml syringe. The appetitive unconditioned stimulus (US+) was a sucrose solution (50% w/w); the aversive unconditioned stimulus (US-) was a quinine (purity 90%, Sigma Aldrich, France) solution (1% w/w).

Experimental design

In order to test whether olfactory generalization gradients were influenced by olfactory experience, ants were subjected either to absolute or to differential pavlovian conditioning of the *maxilla-labium* extension response (MaLER) (Guerrieri and d’Ettorre, 2010).

In differential conditioning, one odor (the conditioned stimulus CS+) was rewarded with sucrose while in parallel a second odor (the conditioned stimulus CS-) that differed of 2 carbon atoms from the CS+, was punished with quinine. Four odor combinations were trained in differential conditioning: hexanal+/octanal-; heptanal+/nonanal-; octanal+/hexanal-; nonanal+/hexanal-, where + indicates the reward and - the punishment. Training consisted of 12 trials (6 CS+ trials and 6 CS- trials presented in pseudo-random order, i.e. ABBABAABABBA where A (resp. B) is either the CS+ or the CS-). Each trial lasted 1min. Twenty-five seconds after placing the ant under a binocular, the CS was presented at 2cm to the ant’s head by blowing an air puff during 5s and the ant’s *maxilla-labium* was stimulated during 5s with either sucrose (eliciting the MaLER) in the CS+ trials or with quinine in the CS- trials. US stimulation started 3s after the onset of odor presentation thus producing an overlap of 2s between the two stimulations. The ant was then left in place during 27s in order to avoid context association. An air extractor was placed behind the ant in order to remove remaining odor stimulations.

In absolute conditioning, one odor (the conditioned stimulus CS+) was rewarded with sucrose. The four aldehydes were trained with this conditioning procedure: hexanal+; heptanal+; octanal+; nonanal+, where + indicates the reward. Training consisted of 6 rewarded trials of 1min each, following exactly the same procedure as above. In order to allow similar comparisons in terms of time elapsed between the CS+ presentations in the two training procedures, ants were also placed 6 times in the apparatus during 1min each without any stimulation. Thus, ants were placed 12 times in total in the apparatus (6 CS+ trials and 6 placements free of stimulation in pseudo-random order, i.e. ABBABAABABBA where A (resp. B) is either the CS+ or the placement free of stimulation). For both procedures, individuals that did not respond at least four times to the US were discarded (3.33% in total).

Because in each conditioning procedure 15 ants were tested by trial, the inter-trial interval (ITI) was of 15 min for ants trained with differential conditioning and of 30 min on average for ants trained with absolute conditioning.

Fifteen minutes after training, ants subjected to either absolute or differential conditioning were tested with the four aldehydes in a randomized order. Odors were presented for 5s without US delivery. As for training, each trial lasted 1min, resulting in an ITI of 15min. After the test, a droplet of sucrose was presented to each ant. Only ants that still responded with the MaLER to this sucrose stimulation were included in the statistical analyses (> 99%). Mortality rate during the experiments was of 2.67%.

Data analysis

All statistical analyses were performed with R-2.15.0 (R Development Core Team, 2011).

In training and test trials, the ant's response was scored as 1 when MaLER was visible upon odor presentation; 0 otherwise. The percentage of ants responding to the odors was then calculated.

Generalized linear mixed models (GLMM, package lme4; Bates et al., 2011) with a binomial error structure (logit-link) were used to analyze the acquisition data. Ants' response (0 or 1) was used as response variable. Trials were used as predictor variable (covariate), and individuals and colony of origin as random factors in order to allow for repeated

measurements and adjust for colony origin. In the case of differential conditioning, the stimulus (CS+ and CS-) was used as fixed factor. Interaction between trials and stimulus was included in the model to detect differences in slopes along the trials for the two types of CS. Variations in the response to CS+ or the CS- along trials were revealed with post-hoc tests by applying the same GLMM without the factor stimulus to the respectively reduced set of data (responses to the CS+ or to the CS-).

To test whether the odor used as CS+ influenced the learning rate of ants trained with absolute conditioning, a GLMM with a binomial error structure (logit-link) was used. The ants' response was used as response variable and individuals and colony of origin as random factors for the same reasons as above. Trials were used as predictor variable (covariate) and the odor as fixed factor. Interaction between trials and odor was included in the model to detect differences in slopes along the trials for the four odor used as CS+.

Differences in the ants' response to the conditioned odor (CS+ for ants trained with absolute conditioning and CS+ and CS- for ants trained with differential conditioning) between the last trial of the conditioning and the test were detected by means of a McNemar's Chi Square test.

The influence of the conditioning procedure on the rate of acquisition of the CS+ was tested with GLMMs with a binomial error structure (logit-link). The response to the CS+ of ants trained with absolute or differential conditioning was used as response variable and individuals and colony of origin as random factors. Trials were used as predictor variable (covariate) and the conditioning procedure as fixed factor. Interaction between trials and conditioning procedure was included in the model to detect differences in slopes for the CS+ along the trials between ants trained with absolute and differential conditioning.

Differences in the response to CS+ in the test between ants subjected to absolute and differential conditioning were detected with Fisher's Exact Test.

The ants' responses to the four aldehydes in the test were compared with Cochran's Q tests and multiple McNemar's Chi Square tests with sequential Bonferroni corrections were applied for pairwise comparisons between test odors.

Generalization gradients modelling

As the shapes of generalization gradients obtained after differential conditioning in our experiments could be accounted by assuming that discrimination learning relies on the interaction of both excitatory and inhibitory gradients mediated by the CS+ and the CS-, respectively (Spence, 1936, 1937; Hanson, 1959; Ghirlanda and Enquist, 2003) (see results), we fitted excitatory and inhibitory gradients to the experimental data in order to test whether the interaction of both gradients and therefore this theory accounted for our results.

Generalization gradients obtained after differential conditioning were fitted by the linear sum of excitatory and inhibitory generalization gradients with different functional forms and different numbers or free parameters (see Supplementary Material). Excitatory generalization gradients were fitted according to the data obtained after absolute conditioning (i.e. generalization gradients).

All fits were performed with the MATLAB non-linear curve fit function *lsqnonlin* which performs a heuristic non-linear least-squares fit. The best fit was chosen on the basis of the mean squared residual errors ($\sum (x - \hat{x})^2$) across all four experiments and by checking the goodness of fit visually (see Supplementary material).

Accordingly, the best fit was obtained by fitting concurrently the functions

$$g_1(x, \sigma) = \exp\left(\frac{x^2}{2\sigma^2}\right)$$

and

$$g_1(x, \sigma) - g_4(x, \sigma', A') = \exp\left(\frac{x^2}{2\sigma^2}\right) - A' \exp\left(\frac{x^2}{2\sigma'^2}\right)$$

Where σ and σ' denote the standard deviation of excitatory and inhibitory gradients respectively, and A' denotes the amplitude of the inhibitory gradient. Note that the $g_1(x, \sigma)$ function (excitatory generalization gradient) is like the $g_4(x, \sigma', A')$ function (inhibitory generalization gradient) with fixed amplitude to 100%.

Results

Odors learning

Ants trained following an absolute conditioning protocol learned successfully all odors, as revealed by a significant effect of conditioning trials on the level of conditioned responses ($22.50 < \chi^2 < 37.29$; $p < 0.001$ for all odors) and by the high level of conditioned responses (approximately 100%) reached in the last trial (Figure 1). All trained aldehydes were equally learned as indicated by a non-significant effect of the conditioning odor on the level of conditioned responses ($\chi^2 = 1.15$; $p = 0.76$). They were also well retained 15 min after training as all ants responded to their conditioned odor in the test (Figure 1) and the levels of conditioned responses in the test were similar to those recorded in the last conditioning trial (for all odors, $\chi^2 = 0$; $p = 1$).

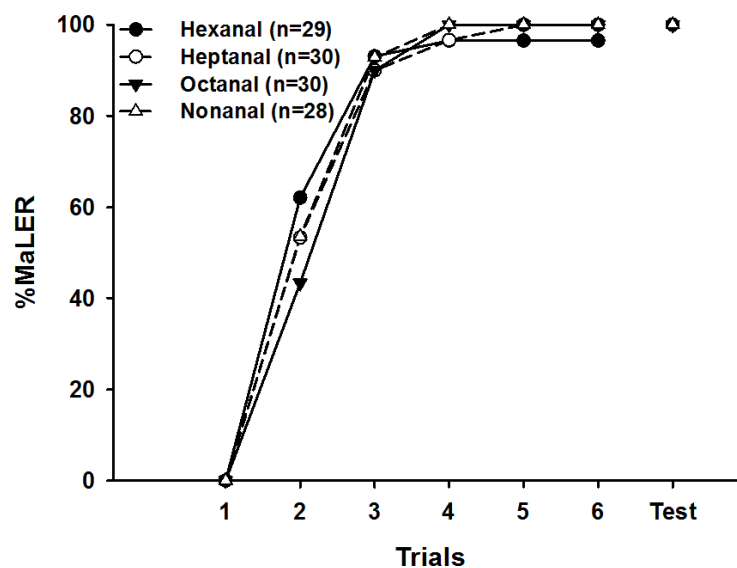


Figure 1: Learning curves of odors trained with absolute conditioning. The percentage of ants responding to the conditioned odor with the *Maxilla-Labium* extension response (%MaLER) is represented along the six consecutive trials. Hexanal (n=29), heptanal (n=30), octanal (n=30) and nonanal (n=28) were successfully and equally learned. All odors were also well retained 15 min after conditioning as all ants responded to their conditioning odor in the test (shown as separate plot in the same graphs).

Ants trained following a differential conditioning protocol learned to differentiate the CS+ from the CS- along the successive trials in all odor combinations tested, as indicated by a significant interaction between trials and CSs ($39.49 < \chi^2 < 57.19$; $p < 0.001$ in all cases) (Figure 2). In the last trial, ants discriminated well both types of CSs as shown by the high level of conditioned responses to the CS+ (approximately 73.92%) and the low level of response to the CS- (approximately 3.19%; $11.04 < \chi^2 < 18.63$; $p < 0.001$ for odor combinations octanal+/hexanal-, heptanal+/nonanal- and nonanal+/heptanal-; $\chi^2 = 2.79$; $p = 0.09$ for the hexanal+/octanal- combination). Post-hoc analyses revealed a significant effect of trials on the level of responses to the CS- for the octanal+/hexanal- and heptanal+/nonanal- combinations ($7.08 < \chi^2 < 9.55$; $p < 0.01$ in both cases), thus indicating that, although the level of responses to the CS- was high in the first trials, ants learned to stop responding to the CS- along the remaining conditioning trials. On the other hand, the level of responses to the CS- did not change for the two other combinations (hexanal+/octanal-: $\chi^2 = 0$; $p = 0.95$; nonanal+/heptanal-: $\chi^2 = 2.45$; $p = 0.10$) and remained relatively low. A significant effect of trial was also found for the responses to the CS+, thus indicating that ants increased their response to the rewarded odor along successive trials ($51.80 < \chi^2 < 65.59$; $p < 0.001$ in all odor combinations).

Ants remembered well the rewarded and punished odors 15min after differential conditioning (Figure 2) as they showed a high (75.80%) and a low (2.49%) level of conditioned responses in the test for the CS+ and the CS-, respectively. The level of conditioned responses remained stable in the test compared to that in the last conditioning trial for both CS (CS+: $0.17 < \chi^2 < 0.44$; $0.51 < p < 0.68$ and CS-: $0 < \chi^2 < 0.5$; $0.47 < p < 1$).

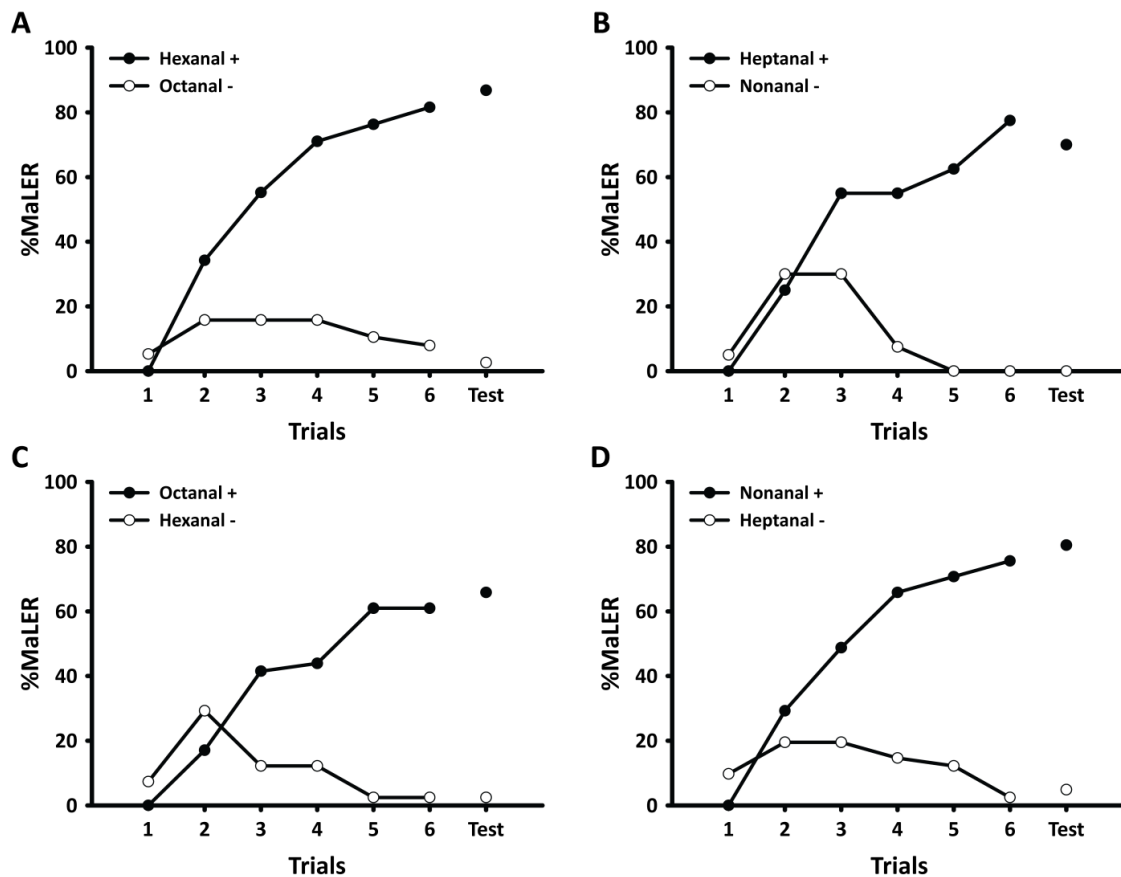


Figure 2: Learning curves of odors trained with differential conditioning. The percentage of ants responding to the rewarded odor (CS+; black symbols) and to the punished odor (CS-; white symbols) with MaLER is represented along the six consecutive trials after training to **(A)** hexanal+/octanal- (n=38); **(B)** heptanal+/nonanal- (n=40); **(C)** octanal+/hexanal- (n=41); **(D)** nonanal+/heptanal- (n=41). All odors differing in two carbon atoms were successfully differentiated as a result of increasing number of trials. All odors discriminations were also well retained 15 min after conditioning as high levels of response for the CS+ and low levels of response for the CS- were recorded in the test (shown as separate plot in the same graphs).

Comparing acquisition between conditioning protocols

A comparative analysis between absolute and differential conditioning is possible by focusing on how the same CS+ odor is learned and memorized depending on the presence/absence of a CS- odor. Figure 3 shows that the conditioning procedure affected the acquisition rate of the CS+ as a significant interaction between trials and conditioning procedure was found in all cases ($6.32 < \chi^2 < 13.75$; $p < 0.05$). Consequently, the level of conditioned responses to the CS+ in the test was significantly lower for ants trained with

differential conditioning (Fisher's Exact Test, $0.001 < p < 0.06$). The higher learning performances displayed by ants trained with absolute rather than with differential conditioning indicates that the introduction of a CS- differing in 2 carbons from the CS+ reduced significantly the learning success of the CS+; i.e. learning to discriminate similar odors is more difficult than learning the absolute properties of a single rewarded odor.

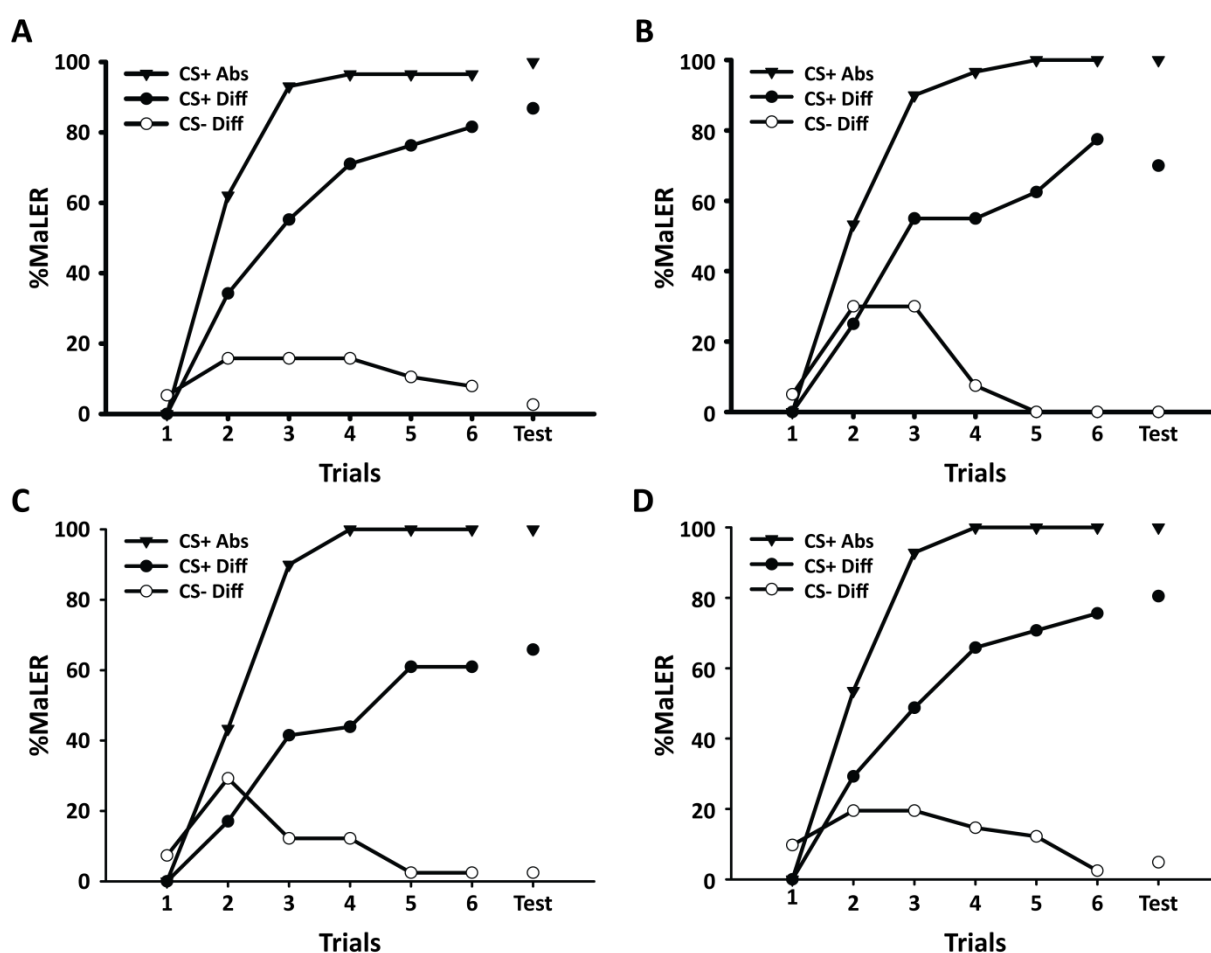


Figure 3: Ants trained with absolute conditioning learn faster and better than ants trained with differential conditioning. The percentage of ants responding with the MaLER to the rewarded odor after absolute conditioning (CS+; black triangles) and the percentage of ants responding to the rewarded odor and to the punished odor after differential conditioning (CS+, black dots; CS-, white dots, respectively) are represented along the six consecutive trials. The levels of response to the train odors are shown with separate plots in the same graphs. **(A)** hexanal+ vs. hexanal+/octanal-; **(B)** heptanal+ vs. heptanal+/nonanal-; **(C)** octanal+ vs. octanal+/hexanal-; **(D)** nonanal+ vs. nonanal+/heptanal-. The sample sizes are the same as in Figure 1 and 2. The presence of the CS- reduces the learning success of the CS+ as shown by lower rates of acquisition and lower levels of responses in the test to the CS+ for ants trained with differential conditioning compared to ants trained with absolute conditioning.

Olfactory generalization

After absolute conditioning, ants showed not only high level of responses to their conditioning odor but also to the other test odors (light grey bars in Figure 4), i.e. ants highly generalized among aldehydes. Generalization levels were inversely proportional to the difference in the carbon-chain length between the conditioning and the test odor, i.e. the lower the difference in the number of carbon atoms, the higher the level of generalization. For instance, after hexanal+ training (light grey bars in Figure 4A), ants responded similarly to heptanal (differing in 1 carbon from hexanal), less to octanal (differing in 2 carbons from hexanal) and even less to nonanal (differing in 3 carbons from hexanal). The shape of the generalization gradients therefore shows that carbon-chain length is a relevant dimension for graded olfactory similarity in ants.

Olfactory similarity was affected by the training procedure as revealed by differences in generalization gradients after absolute and differential conditioning (comparison of light vs. dark grey bars in Figure 4). Indeed, after differential conditioning, the generalization levels were lower for odors that had a carbon-chain length relation to the CS+ similar to that of the CS-. In other words, if the CS- had a shorter carbon-chain length than that of the CS+, discrimination was improved only for odors having a shorter carbon-chain length than that of the CS+. Reciprocally, if the CS- had a longer carbon-chain length than that of the CS+, discrimination was improved for odors having a longer carbon-chain length than that of the CS+. For instance, after octanal+/hexanal- training (i.e. the CS- has a shorter carbon-chain length than the CS+), the level of responses to heptanal, which has a shorter carbon-chain length than octanal, is significantly lower than the level of response to octanal (dark grey bars in Figure 4C) whereas these levels were similar after absolute conditioning (light grey bars in Figure 4C). On the other hand, the level of responses to nonanal, which has a longer carbon-chain length than octanal, was similar to that of octanal (dark grey bars in Figure 4C), as found after absolute conditioning (light grey bars in Figure 4C). Differential learning therefore improved the ants' perceptual discrimination but only for odors that had a carbon-chain length relation to the CS+ similar to that of CS-. Consequently, generalization gradients after differential conditioning were asymmetric with higher levels of response for odors away from the CS+ in the opposite direction from the CS-; a phenomenon called area shift (see ten Cate and Rowe, 2007).

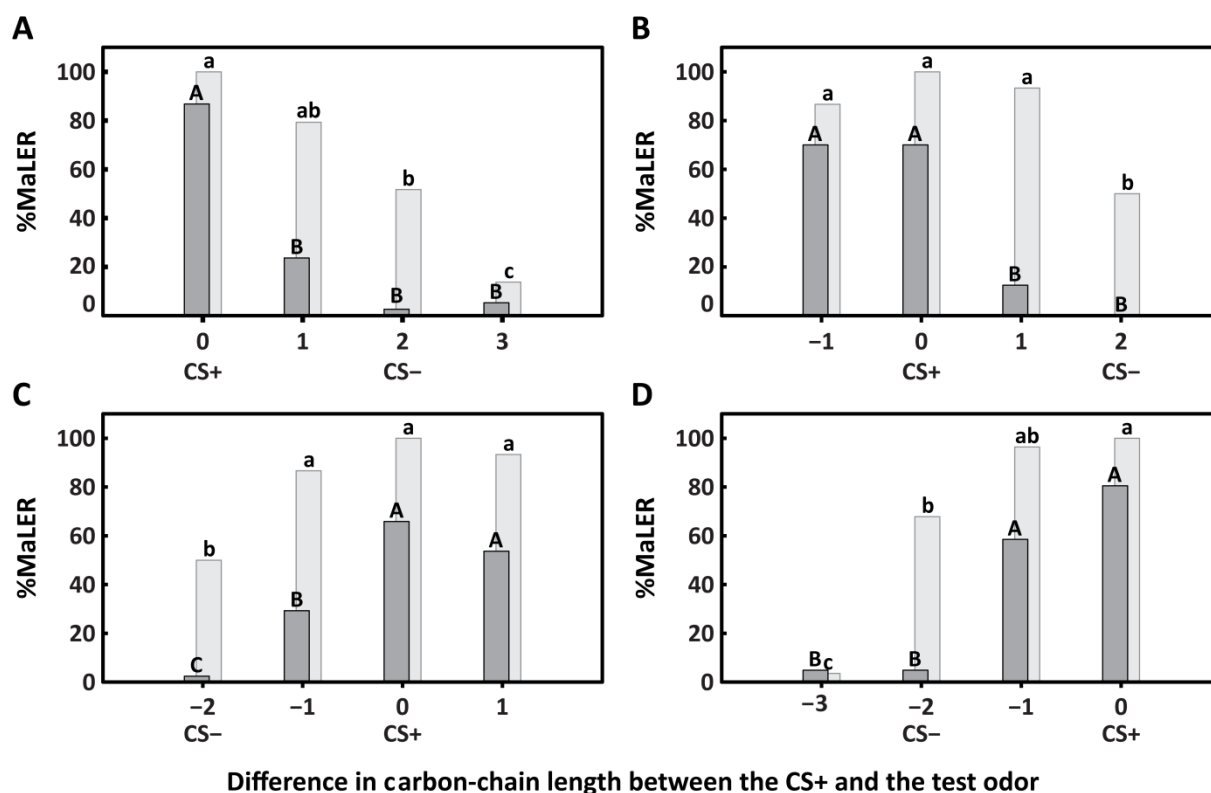


Figure 4: Differential learning improves olfactory discrimination. The percentage of ants responding with the MaLER to the test odors hexanal, heptanal, octanal and nonanal (bars from left to right) is represented for ants trained with absolute (light grey bars) and differential (dark grey bars) conditioning. The x-axis shows the difference in carbon-chain length between the CS+ and the test odor. The odors used as CS+ and CS- during conditioning are indicated. **(A)** hexanal+ vs. hexanal+/octanal-; **(B)** heptanal+ vs. heptanal+/nonanal-; **(C)** octanal+ vs. octanal+/hexanal-; **(D)** nonanal+ vs. nonanal+/heptanal-. The ants response to the test odors was different after absolute ($29.4 < \text{Cochran's } Q < 61.81$; $p < 0.001$ in all cases) and differential ($51.78 < \text{Cochran's } Q < 75$; $p < 0.001$ in all cases) conditioning. Different letters indicate significant differences in the levels of responses to test odors for ants trained with absolute (lower case) and differential (capital letters) conditioning (multiple McNemar's Chi Square tests with sequential Bonferroni corrections). Generalization gradients obtained after absolute conditioning (light grey bars) show that carbon-chain length is a relevant axis for graded perceptual similarity in ants as the response levels were inversely related to the difference in the number of carbons between the conditioned and the test odor. Generalization gradients obtained after differential conditioning (dark grey bars) illustrate the enhancement of discrimination abilities after differential conditioning as the level of response for odors differing from 1 (upper panel) or -1 (lower panel) carbon with the CS+ were significantly lower than the level response to the CS+ whereas these levels were similar after absolute conditioning. For instance, **(A)** shows that after hexanal+/octanal- training (dark grey bars) the level of response to heptanal (differing in 1 carbon from the CS+) was significantly lower than the response to hexanal (CS+) whereas after hexanal+ training (light grey bars) the response to heptanal was similar to hexanal.

The enhanced perceptual discrimination resulting from differential learning and the area shift effect are commonly accounted by assuming that generalization gradients following differential conditioning result from the interaction (i.e. algebraic summation) of excitatory and inhibitory gradients mediated, respectively, by the positively (CS+) and negatively (CS-) reinforced stimuli (Spence, 1936; Hanson, 1959; Ghirlanda and Enquist, 2003). Thus, we aimed at modelling excitatory and inhibitory gradients in order to verify that this theory accounted for the improvement of discrimination abilities displayed by the ants.

Generalization gradient modelling

Excitatory generalization gradients (blue curves in Figure 5) were obtained by fitting a Gaussian function to the data obtained after absolute conditioning. This function was characterized with only one free parameter: the standard deviation σ (Table 1). Inhibitory generalization gradients (red curves in Figure 5) were obtained with a Gaussian functions with 2 free parameters: σ' and the amplitude A' (Table 1). As explained in the methods section, the functions of excitatory and inhibitory generalization gradients were similar but with fixed amplitude to 100% for excitatory generalization gradient. This mirrors the experimental data of generalization gradients obtained after absolute conditioning where all ants (100%) responded to their trained odor in the test. The peaks of the excitatory and inhibitory generalization gradients (blue and red dashed lines) were centered on the CS+ and the CS- respectively, as we assume that the maximum of excitation and inhibition were provided by the CS+ and the CS-. Generalization gradients after differential conditioning (black curve in Figure 5) were obtained by fitting the linear sum of the excitatory and inhibitory generalization gradients.

Generalization gradients after differential conditioning were well accounted by fitting a linear sum of excitatory and inhibitory gradients (Figure 5), as shown by the low mean square error across all experiments (MSE=0.0043) and by the visual inspection of the fits. Therefore our experimental data argue in favor of an interaction between the excitatory and inhibitory effects mediated by the CS+ and the CS-, respectively.

Figure 5 shows that differential conditioning induced a peak shift in generalization gradient, indeed, the position of the peak (black dashed line) was not centered on the CS+ as for excitatory gradient (blue dashed line). In all experiments, the peak of the generalization

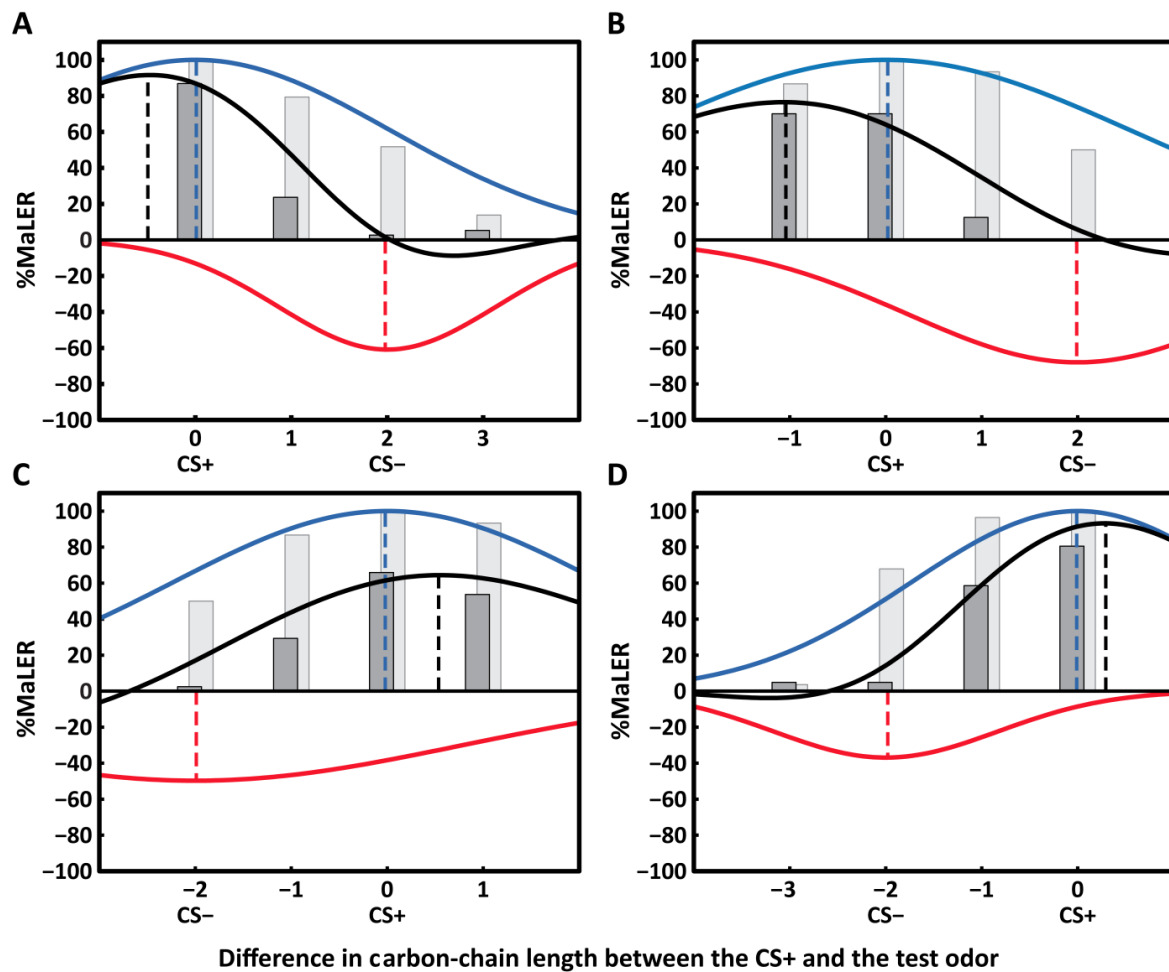


Figure 5: The enhancement of olfactory discrimination relies on both excitatory and inhibitory gradients respectively mediated by the rewarded and punished odor. The percentage of ants responding with the MaLER to the test odors hexanal, heptanal, octanal and nonanal (bars from left to right) is represented for ants trained with absolute (light grey bars) and differential (dark grey bars) conditioning. The x-axis shows the difference in carbon-chain length between the CS+ and the test odor. The odors used as CS+ and CS- during conditioning are indicated. Excitatory gradients (blue curves) are fitted to the responses to test odors after absolute conditioning concurrently with the linear sum of excitatory and inhibitory gradients (red curves), in order to account for the generalization gradients obtained after differential conditioning (black curves). The position of the peak of each gradient is indicated with dotted lines. **(A)** hexanal+ vs. hexanal+/octanal-; **(B)** heptanal+ vs. heptanal+/nonanal-; **(C)** octanal+ vs. octanal+/hexanal-; **(D)** nonanal+ vs. nonanal+/heptanal-. The interaction of excitatory and inhibitory gradients accounts for the improvement of discrimination abilities and the area shift revealed after differential conditioning in behavioral experiments.

gradient after differential conditioning was shifted away from the CS+ in the opposite direction from the CS-. This peak-shift illustrates well the area shift found in experimental conditions.

Excitatory and inhibitory gradients differed consistently in their shapes. In all experiments, the amplitude (A') of the inhibitory gradient was always lower than the one of the excitatory gradient, which was set at 100% (Table 1). Thus, the weight of the inhibition provided by the CS- was lower than the weight of the excitation provided by the CS+. The standard deviation of the inhibitory gradient (σ') was also lower than the standard deviation of the excitatory gradient (σ) except for octanal+/hexanal- (Table 1). Thus, the inhibitory gradient was generally narrower than the excitatory one, indicating that the inhibitory effect of the CS- is more specific than the excitatory effect of the CS+.

Experiment	σ	σ'	A' (%)
hexanal+/octanal-	2.0399	1.1398	60.91
heptanal+/nonanal-	2.5591	1.7715	68.00
octanal+/hexanal-	2.2236	2.7740	49.76
nonanal+/heptanal-	1.7273	1.1700	36.93

Table 1: Summary of fitted parameters for excitatory and inhibitory gradients. The parameters σ and σ' denote the standard deviations of the curves for excitatory and inhibitory gradients respectively. The parameter A' is the amplitude of the curve of the inhibitory gradient. Note that for excitatory gradients the amplitude was set to 100%.

Discussion

In the present study, we investigated olfactory generalization in ants, with the goal of determining how olfactory experience shapes their evaluation of odor similarity relationships. By adopting a systematic analysis comparing absolute vs. differential conditioning, we show for the first time that carbon-chain length is a relevant dimension in ant olfactory perception and that learning to discriminate odors differing in carbon-chain length enhances olfactory discrimination along this dimension. In other words, olfactory similarity relationships are not absolute but vary with the conditioning procedure. Moreover, we demonstrate that the enhanced olfactory discrimination after differential learning relies on the interaction of excitatory and inhibitory effects respectively mediated by the CS+ and the CS-.

We found that after absolute conditioning ants strongly generalized among aldehydes, a phenomenon previously demonstrated in honeybees (Smith and Menzel, 1989; Laska et al., 1999a; Guerrieri et al., 2005). Moreover, generalization levels were inversely related to the difference in the number of carbons between the conditioned and the test odor (Figure 4). These results are in accordance with behavioral experiments performed both in vertebrates (Laska and Freyer, 1997; Laska and Teubner, 1998, 1999; Laska et al., 1999a; Linster and Hasselmo, 1999; Laska and Hübener, 2001; Cleland et al., 2002) and invertebrates (Laska et al., 1999a; Guerrieri et al., 2005; Daly et al., 2001) showing that olfactory generalization depends on the similarity between odors in terms of carbon-chain length. Therefore, the relevance of this chemical dimension for olfactory perception appears to be widespread among animals.

Our study shows that generalization did not only rely on the odor chemical dimensions but depended also on the conditioning procedure used to train the ants. Indeed, after absolute conditioning, the ants' response was similar for the conditioning odor and for odors differing in one carbon atom with the trained odor, indicating that they did not discriminate between these odors; yet these odors could be discriminated after differential conditioning (Figure 4). This result has a fundamental importance because it questions the absolute nature of olfactory perception. It shows that different similarity relationships between odors can be found depending on the conditioning procedure so that studies on olfactory

perception should carefully consider that the way a subject perceives odor similarity relationships depends on the way it learned to respond to odors. For instance, a recent study in *Drosophila melanogaster* combining optical imaging with olfactory psychophysics has shown that differential conditioning enhances perceptual and neural discrimination of odor cues (Barth et al., 2014). As a consequence, initially similar, confusable stimuli (alcohols with equal carbon-chain lengths, differing only by one covalent bond) become discriminable after differential conditioning, paralleling the spatial divergence of activity patterns in the mushroom body (a higher order structure receiving olfactory information).

Comparable conclusions have been reached for color similarity relationships in bees, where absolute and differential conditioning yield different discrimination and generalization performances for the same color stimuli (Dyer and Chittka, 2004; Giurfa, 2004; see review in Avarguès-Weber and Giurfa, 2014). It thus seems that perceptual performances, irrespectively of the modality considered, are significantly modulated by the kind of experience gathered by an animal.

The improved discrimination abilities displayed by the ants trained with differential conditioning were however not extended to all odors tested but were observed in odors that had had a carbon-chain length relation to the CS+ similar to that of CS-. For instance, when the carbon-chain length of the CS- was shorter than that of the CS+, discrimination was improved only for odors having a shorter carbon-chain length than the CS+. Indeed, generalization gradients obtained after differential conditioning were asymmetric around the CS+; i.e. the level of response was maximal for the CS+ and higher levels of response were recorded for novel stimuli away from the CS+ in the opposite direction of the CS-; a phenomenon called “area shift” (ten Cate and Rowe, 2007). Area shift is a less extreme version of the “peak shift effect” (Spence, 1937; Hanson, 1959; ten Cate and Rowe, 2007; Ghirlanda and Enquist, 2003) which is defined by higher levels of response for novel stimuli away from the CS+ in the opposite direction of the CS-; that is the levels of response are not maximal for the CS+. Area shift (or peak shift) in generalization gradient obtained after differential learning have already been observed in the olfactory modality of insects: in moths, with alcohols differing in 2 carbons or with alcohols and ketones differing in 2 carbons (Daly et al., 2001), and in honeybees with odor binary mixtures varying in the

proportion of mixture components (Wright et al., 2009; Fernandez et al., 2009). Therefore, this effect appears to be consistent in insects when learning to discriminate similar odors.

The enhanced perceptual discrimination induced by discrimination learning and area shift (or peak shift) are commonly accounted by assuming that generalization gradients resulting from differential conditioning are determined by the interaction (i.e. algebraic summation) between excitatory and inhibitory generalization gradients mediated by the positively (CS+) and negatively (CS-) reinforced stimuli, respectively (Spence, 1937; Hanson, 1959; Ghirlanda and Enquist, 2003). Thus, by learning to discriminate similar stimuli that differ along the same perceptual dimension, excitatory and inhibitory gradients would overlap along this dimension, resulting in higher discrimination abilities for stimuli away from the CS+ toward the CS- and therefore an area or peak shift in the generalization gradient after differential conditioning would emerge. In our study, modelling the linear sum of excitatory and inhibitory gradients accounted well for the shapes of the experimental generalization gradients obtained after differential conditioning (Figure 5; Table 1), thus arguing in favor of this theory. Moreover, modelling allowed us to define the shapes of excitatory and inhibitory gradients and therefore to characterize how excitatory and inhibitory effects of the CS+ and the CS- accounted for the enhanced olfactory discrimination displayed by the ants.

We found that inhibitory gradients had lower amplitude than excitatory gradients (Figure 5; Table 1). Several hypotheses that are not necessarily mutually exclusive could explain these results. The first one would be that the quinine concentration was not large enough to induce an inhibition comparable to the excitation provided by the sucrose solution, as suggested by a previous study in *Camponotus fellah* (Josens et al., 2009). By increasing the quinine concentration, we would be able to test whether the amplitude of the inhibitory gradient could increase. However, the amplitude of the inhibition does not seem to rely only on quinine concentration, as different amplitudes were found for inhibitory gradients (Table 1) whereas the quinine concentration was identical in all conditions. A second hypothesis would be that the negative hedonic value of quinine is inferior to the positive hedonic value provided by sucrose. Recent experiment in honeybee learning (de Brito Sanchez et al, submitted) have shown that concentrated quinine solution is not a strong aversive reinforcer for harnessed bees subjected to differential olfactory conditioning; on the contrary,

concentrated NaCl solution was more effective and induced better olfactory discrimination. It is thus possible to assess whether saline solution also increases the amplitude of the inhibitory gradient in ants. The third hypothesis would be that the excitatory effect mediated by the sucrose solution always prevails over the inhibitory effect mediated by the US-. Acquisition curves of differential conditioning found in our study (Figure 2) and typically found in ants and honeybees (e.g. Hammer and Menzel, 1995; Menzel and Giurfa, 2001; Komischke et al., 2002; Guerrieri and d' Ettore, 2010; van Wilgenburg et al., 2012) argue in favor of this hypothesis. Indeed, in pavlovian conditioning the stimuli used as CS are initially neutral therefore learning to discriminate odorants results more in an increase of the response to the CS+ rather than in a decrease of the response to the CS- which remain relatively low even if animals generalize from the CS+ to the CS- in the first trials of conditioning.

Inhibitory gradients were generally narrower than excitatory gradients, meaning that the inhibitory effect of the CS- is more specific than is the excitatory effect of the CS+ (Figure 5; Table 1). This higher specificity for the inhibitory effect of the CS- would be suitable for learning the discrimination of the CS+ from the CS-. Indeed, an excessive overlap of excitatory and inhibitory gradient would decrease considerably the ants' response to the CS+. This hypothesis is supported by our results showing that the higher the standard deviation of the inhibitory gradient (Table 1) the higher the difficulties for ants to learn to differentiate the odors (Figure 2). The result showing that the inhibitory gradient spreads to all tested odors, including CS+, would explain why it was more difficult for ants to learn to discriminate similar stimuli than learning the absolute properties of the CS+ (Figure 3) or why it is generally difficult to learn to discriminate similar odors than dissimilar odors (Cleland et al., 2002; Deisig et al., 2002; van Wilgenburg et al., 2012). From an adaptive point of view, it would be advantageous to be less specific to the rewarded than to the punished odor in order to favor opportunistic behaviors in novel situations.

Electrophysiological and optophysiological recording techniques available in ants (Galizia et al., 1999; Yamagata et al., 2006; Zube et al., 2008; Dupuy et al., 2010; Brandstaetter et al., 2011; Brandstaetter and Kleineidam, 2011) would be useful to understand how experience shapes the neural circuits underlying olfactory perception in ants. Investigating the neural response of similar odors before and after absolute and differential conditioning would allow

us to know whether the conditioned excitation and the conditioned inhibition mediated respectively by the CS+ and the CS-, as observed with our behavioral experiments, translate into a form of neural excitation and inhibition for the CS+ and the CS- respectively.

Acknowledgments

This work was supported by a Marie Curie Reintegration Grant (Identity Code, FP7-MC-ERG-2009-256524 to P.d.E) and the CNRS research network GDR 2822 Ethologie. M.G. thanks the Institut Universitaire de France.

References

- Avarguès-Weber, A., and Giurfa, M. (2014). Cognitive components of color vision in honey bees: how conditioning variables modulate color learning and discrimination. *J. Comp. Physiol. A* 200, 449–461. doi:10.1007/s00359-014-0909-z.
- Barth, J., Dipt, S., Pech, U., Hermann, M., Riemensperger, T., and Fiala, A. (2014). Differential associative training enhances olfactory acuity in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 34, 1819–1837. doi:10.1523/JNEUROSCI.2598-13.2014.
- Bates, D., Maechler, M., and Bolker, B. (2011). *lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes*. Available at: <http://lme4.r-forge.r-project.org/>.
- Bhatkar, A., and Whitcomb, W. H. (1970). Artificial diet for rearing various species of ants. *Fla. Entomol.* 53, 229. doi:10.2307/3493193.
- Bos, N., Dreier, S., Jørgensen, C. G., Nielsen, J., Guerrieri, F. J., and d' Ettore, P. (2012). Learning and perceptual similarity among cuticular hydrocarbons in ants. *J. Insect Physiol.* 58, 138–146. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.10.010.
- Bos, N., d' Ettore, P., and Guerrieri, F. J. (2013). Chemical structure of odorants and perceptual similarity in ants. *J. Exp. Biol.* 216, 3314–3320. doi:10.1242/jeb.087007.
- Brandstaetter, A. S., and Kleineidam, C. J. (2011). Distributed representation of social odors indicates parallel processing in the antennal lobe of ants. *J. Neurophysiol.* 106, 2437–2449. doi:10.1152/jn.01106.2010.
- Brandstaetter, A. S., Rössler, W., and Kleineidam, C. J. (2011). Friends and foes from an ant brain's point of view--neuronal correlates of colony odors in a social insect. *PLoS One* 6, e21383. doi:10.1371/journal.pone.0021383.
- Ten Cate, C., and Rowe, C. (2007). Biases in signal evolution: learning makes a difference. *Trends Ecol. Evol.* 22, 380–387. doi:10.1016/j.tree.2007.03.006.
- Chapuis, J., and Wilson, D. A. (2012). Bidirectional plasticity of cortical pattern recognition and behavioral sensory acuity. *Nat. Neurosci.* 15, 155–161. doi:10.1038/nn.2966.
- Chen, C.-F. F., Barnes, D. C., and Wilson, D. A. (2011). Generalized vs. stimulus-specific learned fear differentially modifies stimulus encoding in primary sensory cortex of awake rats. *J. Neurophysiol.* 106, 3136–3144. doi:10.1152/jn.00721.2011.
- Cleland, T. A., Morse, A., Yue, E. L., and Linster, C. (2002). Behavioral models of odor similarity. *Behav. Neurosci.* 116, 222–231. doi:10.1037/0735-7044.116.2.222.
- Daly, K. C., Chandra, S., Durtschi, M. L., and Smith, B. H. (2001). The generalization of an olfactory-based conditioned response reveals unique but overlapping odour representations in the moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 204, 3085–3095.

- Deisig, N., Lachnit, H., and Giurfa, M. (2002). The effect of similarity between elemental stimuli and compounds in olfactory patterning discriminations. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 9, 112–121. doi:10.1101/lm.41002.
- Dudareva, N., Pichersky, E., and Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135, 1893–1902. doi:10.1104/pp.104.049981.
- Dupuy, F., Josens, R., Giurfa, M., and Sandoz, J.-C. (2010). Calcium imaging in the ant *Camponotus fellah* reveals a conserved odour-similarity space in insects and mammals. *BMC Neurosci.* 11, 28. doi:10.1186/1471-2202-11-28.
- Dupuy, F., Sandoz, J.-C., Giurfa, M., and Josens, R. (2006). Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Anim. Behav.* 72, 1081–1091. doi:10.1016/j.anbehav.2006.03.011.
- Dyer, A. G., and Chittka, L. (2004). Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften* 91, 224–227. doi:10.1007/s00114-004-0508-x.
- Fernandez, P. C., Locatelli, F. F., Person-Rennell, N., Deleo, G., and Smith, B. H. (2009). Associative conditioning tunes transient dynamics of early olfactory processing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 10191–10202. doi:10.1523/JNEUROSCI.1874-09.2009.
- Galizia, Menzel, and Hölldobler (1999). Optical imaging of odor-evoked glomerular activity patterns in the antennal lobes of the ant *Camponotus rufipes*. *Naturwissenschaften* 86, 533–537.
- Ghirlanda, S., and Enquist, M. (2003). A century of generalization. *Anim. Behav.* 66, 15–36. doi:10.1006/anbe.2003.2174.
- Giurfa, M. (2004). Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften* 91, 228–231. doi:10.1007/s00114-004-0530-z.
- Guerrieri, F. J., and d' Ettore, P. (2010). Associative learning in ants: conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *J. Insect Physiol.* 56, 88–92. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.09.007.
- Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J.-C., and Giurfa, M. (2005). Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol.* 3, e60. doi:10.1371/journal.pbio.0030060.
- Guttman, N., and Kalish, H. I. (1956). Discriminability and stimulus generalization. *J. Exp. Psychol.* 51, 79–88. doi:10.1037/h0046219.
- Hammer, M., and Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 1617–1630.
- Hanson, H. M. (1959). Effects of discrimination training on stimulus generalization. *J. Exp. Psychol.* 58, 321–334. doi:10.1037/h0042606.
- Hölldobler, B., and Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. 1st edition. Cambridge, Mass: Belknap Press.

- Josens, R., Eschbach, C., and Giurfa, M. (2009). Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants. *J. Exp. Biol.* 212, 1904–1911. doi:10.1242/jeb.030080.
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., and Ståhl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent. *Bot. Rev.* 72, 1–120. doi:10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOFS]2.0.CO;2.
- Komischke, B., Giurfa, M., Lachnit, H., and Malun, D. (2002). Successive Olfactory Reversal Learning in Honeybees. *Learn. Mem.* 9, 122–129. doi:10.1101/lm.44602.
- Laska, M., and Freyer, D. (1997). Olfactory discrimination ability for aliphatic esters in squirrel monkeys and Humans. *Chem. Senses* 22, 457–465. doi:10.1093/chemse/22.4.457.
- Laska, M., Galizia, C. G., Giurfa, M., and Menzel, R. (1999a). Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees. *Chem. Senses* 24, 429–438.
- Laska, M., and Hübener, F. (2001). Olfactory discrimination ability for homologous series of aliphatic ketones and acetic esters. *Behav. Brain Res.* 119, 193–201. doi:10.1016/S0166-4328(00)00348-X.
- Laska, M., and Teubner, P. (1998). Odor structure-activity relationships of carboxylic acids correspond between squirrel monkeys and humans. *Am. J. Physiol.* 274, R1639–1645.
- Laska, M., and Teubner, P. (1999). Olfactory discrimination ability for homologous series of aliphatic alcohols and aldehydes. *Chem. Senses* 24, 263–270.
- Laska, M., Trolp, S., and Teubner, P. (1999b). Odor structure-activity relationships compared in human and nonhuman primates. *Behav. Neurosci.* 113, 998–1007.
- Linster, C., and Hasselmo, M. E. (1999). Behavioral responses to aliphatic aldehydes can be predicted from known electrophysiological responses of mitral cells in the olfactory bulb. *Physiol. Behav.* 66, 497–502.
- Linster, C., Johnson, B. A., Morse, A., Yue, E., and Leon, M. (2002). Spontaneous versus reinforced olfactory discriminations. *J. Neurosci.* 22, 6842–6845.
- Li, W., Howard, J. D., Parrish, T. B., and Gottfried, J. A. (2008). Aversive learning enhances perceptual and cortical discrimination of indiscriminable odor cues. *Science* 319, 1842–1845. doi:10.1126/science.1152837.
- Martin, J. P., Beyerlein, A., Dacks, A. M., Reisenman, C. E., Riffell, J. A., Lei, H., and Hildebrand, J. G. (2011). The neurobiology of insect olfaction: Sensory processing in a comparative context. *Prog. Neurobiol.* 95, 427–447. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.09.007.
- Menzel, R., and Giurfa, M. (2001). Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn. Sci.* 5, 62–71. doi:10.1016/S1364-6613(00)01601-6.
- Mishra, D., Louis, M., and Gerber, B. (2010). Adaptive adjustment of the generalization-discrimination balance in larval *Drosophila*. *J. Neurogenet.* 24, 168–175. doi:10.3109/01677063.2010.498066.

- Pavlov, I. (1927). *Conditioned reflexes an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. [London]: Oxford University Press Humphrey Milford.
- Perez, M., Rolland, U., Giurfa, M., and d' Etorre, P. (2013). Sucrose responsiveness, learning success, and task specialization in ants. *Learn. Mem.* 20, 417–420. doi:10.1101/lm.031427.113.
- {R Development Core Team} (2011). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing Available at: <http://www.R-project.org>.
- Shepard, R. N. (1987). Toward a universal law of generalization for psychological. *Science* 237, 1317–1323. doi:10.1126/science.3629243.
- Smith, B. H., and Getz, W. M. (1994). Nonpheromonal Olfactory Processing in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 351–375. doi:10.1146/annurev.en.39.010194.002031.
- Smith, B. H., and Menzel, R. (1989). The use of electromyogram recordings to quantify odourant discrimination in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 35, 369–375. doi:10.1016/0022-1910(89)90110-8.
- Spence, K. W. (1937). The differential response in animals to stimuli varying within a single dimension. *Psychol. Rev.* 44, 430–444. doi:10.1037/h0062885.
- Spence, W. K. (1936). The nature of discrimination learning in animals. *Psychol. Rev.* 43, 427–449. doi:10.1037/h0056975.
- Van Wilgenburg, E., Felden, A., Choe, D.-H., Sulc, R., Luo, J., Shea, K. J., Elgar, M. A., and Tsutsui, N. D. (2012). Learning and discrimination of cuticular hydrocarbons in a social insect. *Biol. Lett.* 8, 17–20. doi:10.1098/rsbl.2011.0643.
- Wright, G. A., Choudhary, A. F., and Bentley, M. A. (2009). Reward quality influences the development of learned olfactory biases in honeybees. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2597–2604. doi:10.1098/rspb.2009.0040.
- Yamagata, N., Nishino, H., and Mizunami, M. (2006). Pheromone-sensitive glomeruli in the primary olfactory centre of ants. *Proc. Biol. Sci.* 273, 2219–2225. doi:10.1098/rspb.2006.3565.
- Zube, C., Kleineidam, C. J., Kirschner, S., Neef, J., and Rössler, W. (2008). Organization of the olfactory pathway and odor processing in the antennal lobe of the ant *Camponotus floridanus*. *J. Comp. Neurol.* 506, 425–441. doi:10.1002/cne.21548.

Supplementary material

Generalization gradients modelling

All fits were performed with MATLAB non-linear curve fit function *lsqnonlin* which performs a heuristic non-linear least squares fit. It is possible that this function returns local minima. It is therefore advised to check the goodness of fit visually.

Excitatory generalization gradients were fitted according to the observations of generalization gradients obtained after absolute conditioning with three different functional forms and different numbers of free parameters:

- 1) Gaussian functions of either 1 or 2 parameters

$$g_1(x, \sigma) = \exp\left(\frac{x^2}{2\sigma^2}\right)$$

$$g_2(x, \sigma, A) = A \exp\left(\frac{x^2}{2\sigma^2}\right)$$

- 2) Exponential functions of either 1 or 2 parameters

$$e_1(x, s) = \exp\left(-\frac{|x|}{s}\right)$$

$$e_2(x, s, A) = A \exp\left(-\frac{|x|}{s}\right)$$

- 3) Power laws of either 1 or 2 parameters

$$p_1(x, s) = x^{-s}$$

$$p_2(x, s, A) = Ax^{-s}$$

Experimentally, animals either respond or do not respond to the test stimulus, therefore generalization gradients values range from 0 to 100% of animals responding to the stimulus (i.e. always positive). To enforce the constrain of having positive generalization gradient after differential conditioning, we added a cost function:

$$C = \sum_{i=1}^4 (m_i - f_{\{p\}}(x_i))^2 + k \sum_{i=0}^5 ([f_{\{p\}}(x_i)]_-)^2$$

where $f_{\{p\}}$ denotes the function fitted with parameters $\{p\}$; x_i denotes the difference in carbon-chain length between the CS+ and the test odor i ; m_i denotes the fraction of MaLER observed for the odors tested; $[f]_-$ denotes the negative part of f , i.e. $\min\{f, 0\}$; and k is a free parameter for the weighting of the second cost term. In our case, we used $k = 5$. Additional points were therefore added to the second term of the cost function. These points were $x_0 = x_1 - 1$ and $x_5 = x_4 + 1$. The effect of this second term was that if the curve of the generalization gradient obtained after differential conditioning was negative for the four odors used or for odors having one carbon less (i.e. pentanal) or one carbon more (i.e. decanal), then an extra cost proportional to the amount below zero was added. In order to obtain realistic curves, the possible parameters $\{p\}$ were limited to reasonable ranges: $\sigma, s \in [0.3, 10]$; $A \in [0.1, 1]$. For instance, the upper limit on A limited the excitatory gradient to not exceed 100%, which would be unrealistic.

The observed residual error (sum squared error) for the different fits of excitatory generalization gradients is shown in Figure S1.

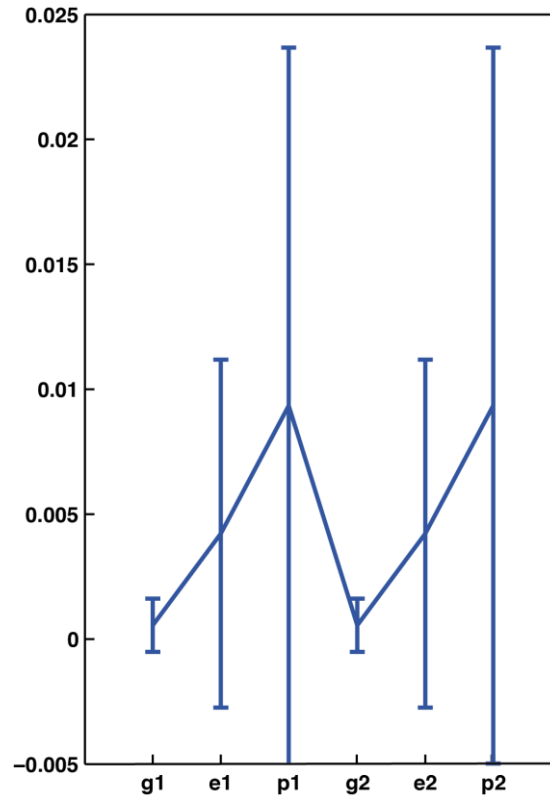


Figure S1: Mean residual errors across all four trained odors, for fits with g_1 , e_1 , p_1 , g_2 , e_2 and p_2 .

The smallest residual errors (and hence best fits) are obtained with Gaussian fits with 1 or 2 parameters. Accordingly, we then fitted the observations for generalization gradients obtained after differential conditioning by linear sums of the previous fit to the corresponding excitatory generalization gradient (i.e. g_1 and g_2) and an inhibitory generalization gradient of one of the functional forms listed above (Gaussian functions, exponential functions and power laws, with 1 or 2 parameters respectively). We also explored the possibility of fitting both data, from generalization gradients obtained after absolute and differential conditioning, concurrently. The mean residual errors observed for these fits are shown in Figure S2.

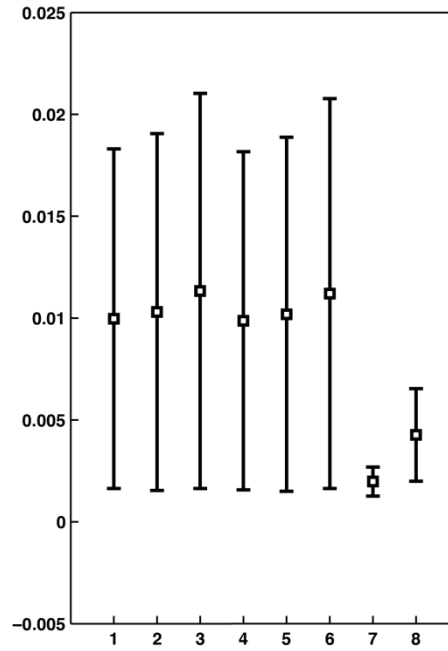


Figure S2: Mean residual errors across all four trained differential conditions for each of the following scenarios: fit with $g_1(\sigma)$ followed by fit with $g_1(\sigma) - g_2(\sigma', A')$ (#1), or followed by fit with $g_1(\sigma) - e_2(s', A')$ (#2), or followed by fit with $g_1(\sigma) - p_2(s', A')$ (#3); fit with $g_2(\sigma, A)$ followed by fit with $g_2(\sigma, A) - g_2(\sigma', A')$ (#4), or followed by fit with $g_2(\sigma, A) - e_2(s', A')$ (#5), or followed by fit with $g_2(\sigma, A) - p_2(s', A')$ (#6). The remaining points are a concurrent fit with $g_2(\sigma, A) - g_2(\sigma', A')$ (#7) and a concurrent fit with $g_1(\sigma) - g_2(\sigma', A')$ (#8).

The best fits were concurrent fits with $g_2(\sigma, A) - g_2(\sigma', A')$ (#7) and with $g_1(\sigma) - g_2(\sigma', A')$ (#8) (Figure S2). With these fits, the limits imposed for each parameter were never reached. According to visual inspection of the curves, the concurrent fit with $g_1(\sigma) - g_2(\sigma', A')$ (Figure S3B) appears slightly better than that with $g_2(\sigma, A) - g_2(\sigma', A')$ (Figure S3A), as excitatory generalization gradients (blue curves) fitted better the observed generalization gradients after absolute conditioning without affecting to a large extent the fit of the generalization gradient obtained after differential conditioning (black curves). Therefore, the concurrent fit with $g_1(\sigma) - g_2(\sigma', A')$ was chosen, although the concurrent fit $g_2(\sigma, A) - g_2(\sigma', A')$ gave similar (good) results.

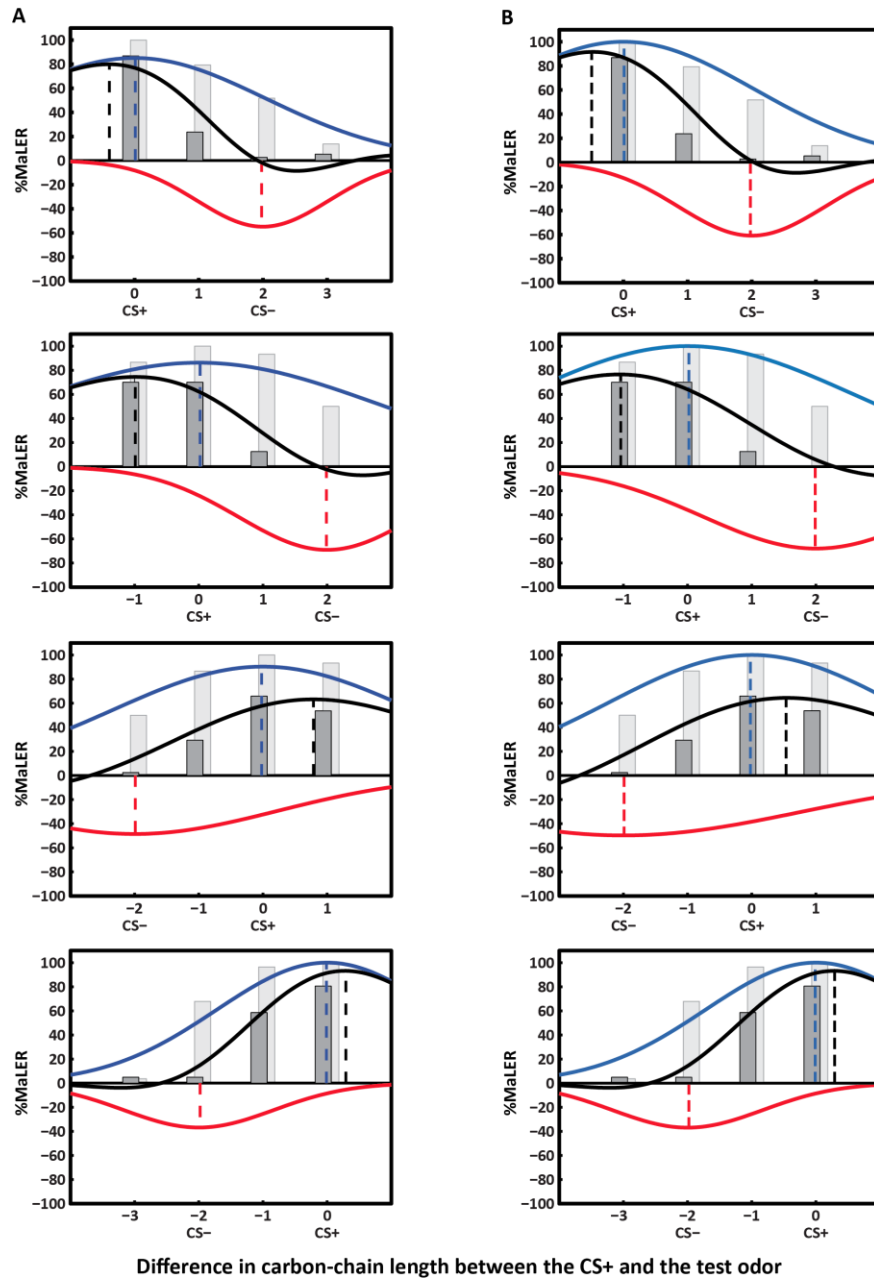


Figure S3: Concurrent fits with (A) $g_2(\sigma, A) - g_2(\sigma', A')$ and (B) $g_1(\sigma) - g_2(\sigma', A')$. The percentage of ants responding with the *Maxilla-Labium* extension response (%MaLER) to the test odors hexanal, heptanal, octanal and nonanal (bars from left to right) is represented for ants trained with absolute (light grey bars) and differential (dark grey bars) conditioning. The x-axis shows the difference in carbon-chain length between the CS+ and the test odor. The odors used as CS+ and CS- during conditioning are indicated. Excitatory gradients (blue curves) are fitted to the responses to test odors after absolute conditioning concurrently with the linear sum of excitatory and inhibitory gradient (red curve), in order to account for the generalization gradient obtained after differential conditioning (black curve). The position of the peak of each gradient is indicated with dotted lines (same color codes as the curves). From top to down: hexanal+ vs. hexanal+/octanal-; heptanal+ vs. heptanal+/nonanal-; octanal+ vs. octanal+/hexanal-; nonanal+ vs. nonanal+/heptanal-.

Chapitre III

The scent of mixtures: rules of odour processing in ants

The scent of mixtures: rules of odour processing in ants

Margot Perez^{1, 2, 3}, Martin Giurfa^{1, 2#} and Patrizia d’Ettorre^{3#*}

¹ Research Center on Animal Cognition; University of Toulouse; UPS; 118 route de Narbonne,
F-31062 Toulouse Cedex 9, France

² Research Center on Animal Cognition; CNRS; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse
Cedex 9, France

³ Laboratory of Experimental and Comparative Ethology, University Paris 13, Sorbonne Paris
Cité, Villetaneuse, France

#These authors contributed equally to this work.

*Correspondence and request for materials should be addressed to:

dettorre@leec.univ-pari13.fr & martin.giurfa@univ-tlse3.fr



Published in *Sci. Rep.* 5, 8659; DOI:10.1038/srep08659 (2015)

Abstract

Natural odours are complex blends of numerous components. Understanding how animals perceive odour mixtures is central to multiple disciplines. Here we focused on carpenter ants, which rely on odours in various behavioural contexts. We studied overshadowing, a phenomenon that occurs when animals having learnt a binary mixture, respond less to one component than to the other, and less than when this component was learnt alone. Ants were trained individually with alcohols and aldehydes varying in carbon-chain length, either as single odours or binary mixtures. They were then tested with the mixture and the components. Overshadowing resulted from the interaction between chain length and functional group: alcohols overshadowed aldehydes, and longer chain lengths overshadowed shorter ones; yet, combinations of these factors could cancel each other and suppress overshadowing. Our results reveal the rules of olfactory mixture processing in ants and set the basis for predictive analyses of odour perception in insects.

Introduction

Odours play a key role in most aspects of animal behaviour. In nature, animals are usually confronted with complex olfactory mixtures, which are composed of numerous components. Thus, the question of how animals perceive and learn odour mixtures is the subject of current debates in fields as diverse as neurosciences¹, experimental psychology², animal behaviour³, computational biology⁴ and chemical ecology⁵, among others. Animals, such as insects, for which odour cues play a significant role in their natural life, constitute suitable models for the study of olfactory mixture perception. In addition, the existence of protocols for olfactory conditioning in these animals allows uncovering the mechanisms underlying the processing of complex odour blends.

A phenomenon particularly useful for studying how animals perceive stimulus mixtures is overshadowing^{6–8}, which occurs when two criteria are fulfilled: 1) an individual trained with a binary mixture responds less to one component ('overshadowed component') than to the other ('overshadowing component'); 2) the response to the overshadowed component is lower than that obtained when this component is trained alone. The occurrence of overshadowing therefore reveals that sometimes animals do not respond to all mixture components, but that the most salient component dominates and drives the animal's responses^{9–11}.

Olfactory overshadowing has been shown in a variety of taxa, including mammals¹², crustaceans¹³ and insects^{14–18} but the rules underlying this phenomenon remain unclear due to the lack of systematic analyses. With their relatively simple brains, insects are valuable models for the study of olfactory perception and learning, both at the behavioural and neurophysiological level^{19,20}. Among insects, the honeybee *Apis mellifera* has been extensively used to this end²¹ but the rules and mechanisms of olfactory overshadowing are still unclear in this insect¹⁸. Ants constitute an interesting model for the study of odour learning and perception, as they are typically confronted to odour mixtures in their natural life (e.g. floral odours when foraging, signature mixtures in nestmate recognition)²². Due to the varieties of their life-history traits and ecological adaptations, ants have gained increased popularity in recent behavioural and neurobiological olfactory research^{23–32}; for instance, controlled olfactory appetitive learning protocols have been established for these

insects^{24,26,29}. As a consequence, the study of perception and learning of odour mixtures is timely and biologically relevant in this taxon.

Here, we aimed at uncovering the rules accounting for olfactory overshadowing in the ant *Camponotus aethiops*, an insect which offers the advantage of being easily conditionable using an appetitive protocol in which it learns to associate an odorant with a reward of sucrose solution²⁶. Ants having learnt the association exhibit the appetitive *maxilla-labium* extension response (MaLER) to the learnt odorant (the conditioned stimulus, or CS). We trained *Camponotus aethiops* ants with odours that are part of floral blends³³ and that are thus relevant for this species, which forages partly on extra-floral nectaries. Conditioned odours were either single odours or binary mixtures of these odours. Four alcohols and four aldehydes, which varied systematically in their carbon-chain length, were arranged in two sets (6 vs. 8 carbons, and 7 vs. 9 carbons) in order to allow similar comparisons between components in terms of functional group and carbon-chain length, two physical dimensions that define a putative olfactory space in insects³⁴. By equilibrating the vapour pressure of all odorants, we aimed at controlling for concentration effects^{12,35}, thus focusing only on functional group and carbon-chain length effects. We show that olfactory overshadowing resulted from the interaction between chain length and functional group. Generally, alcohols overshadowed aldehydes, and longer chain lengths overshadowed shorter ones; yet, a combination of these dimensions could cancel each other and suppress overshadowing. The emergence of these similar, reproducible dominance patterns in the two sets of odours argues in favour of predictive rules based on the chemical proprieties of odours.

Results

Ants successfully learnt and memorized all odour stimuli. In the first experiment, three groups of ants were conditioned in parallel for each combination of two odours, A and B: one group was conditioned to the binary mixture AB (*OVS* group) and the other two to only one of the odour components (A for *Ctrl A* group; B for *Ctrl B* group). In all cases, ants were conditioned along 6 spaced trials. Two sets of four odours (set 1: hexanol, hexanal, octanol, octanal; set 2: heptanol, heptanal, nonanol, nonanal) were used to establish 12 binary mixtures (6 by set of odours). Within each set, odorant molecules varied in their functional

group (aldehyde or alcohol) and carbon number (6 vs 8 carbons for set 1; 7 vs 9 carbons for set 2). In total, 1060 ants were conditioned in this experiment.

Irrespectively of using single odours or binary mixtures as CS, ants efficiently learnt the odour-sucrose association and exhibited a high level (approximately 85%) of conditioned responses at the end of training (Fig. 1). Within each odour set, single odours and binary mixtures were learnt equally well, as revealed by similar levels of conditioned responses in the last trial (Fig. 1a: set 1, single odours: $\chi^2=2.25$; $p=0.52$, binary mixtures: $\chi^2=3.92$; $p=0.56$; Fig. 1b: set 2, single odours: $\chi^2=1.07$; $p=0.78$, binary mixtures: $\chi^2=4.82$; $p=0.44$). Furthermore, we neither found significant differences in the level of conditioned responses between single odours and mixtures (Fig. 1a: set 1, $\chi^2=1.15$; $p=0.28$; Fig. 1b: set 2, $\chi^2=0.07$; $p=0.80$) nor between sets of odours (Fig. 1a, b, single odours: $\chi^2=0.06$; $p=0.81$; binary mixtures: $\chi^2=1.59$; $p=0.21$).

One hour after training, all groups were tested without reinforcement with the mixture AB, each of the odour components (A and B) and a novel odour C, which was unknown to the ants and therefore allowed to measure the tendency to generalise olfactory responses. Odour presentation was randomized in the test. To verify that performances in the memory test did not decay after training, we compared the level of conditioned responses of the learnt odorant in the test with that obtained in the last conditioning trial. Within each odour set, responses in the last conditioning trial did not differ from those recorded in the memory test (Fig. 1a: set 1, single odours: $0 < \chi^2 < 0.5$; $0.48 < p < 1$, binary mixtures: $0 < \chi^2 < 0.5$; $0.48 < p < 1$; Fig. 1b: set 2, single odours: $0.08 < \chi^2 < 0.57$; $0.45 < p < 0.77$, binary mixtures: $0.17 < \chi^2 < 1.33$; $0.24 < p < 0.68$), except for octanol for which responses even increased ($\chi^2=4.27$; $p < 0.05$).

Altogether, these results show that ants successfully learn odour-sucrose associations, both in the case of single odours and binary mixtures, and that the information learnt is efficiently retained one hour after conditioning.

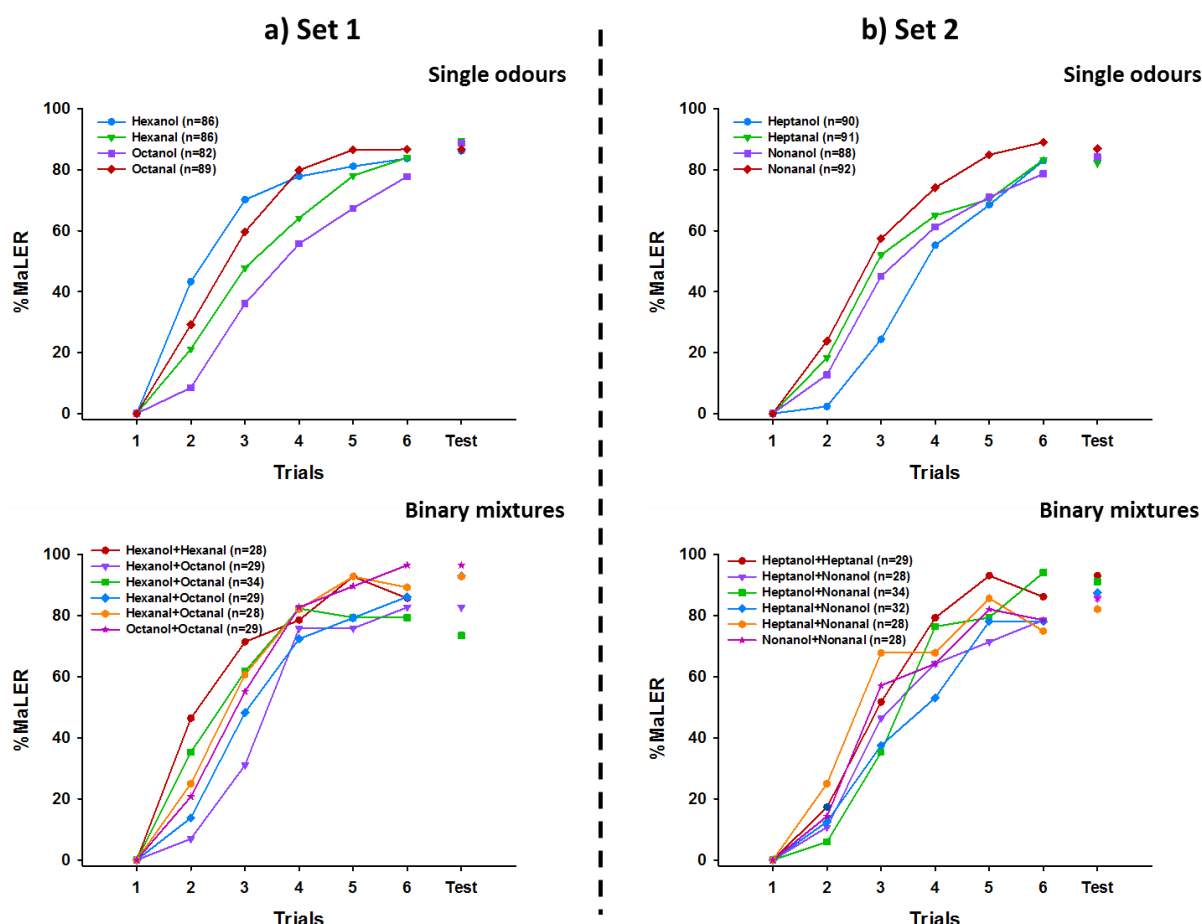


Figure 1: Ants successfully learnt all single odours and binary mixtures. Learning curves of single odours and binary mixtures for odour set 1 (a) and odour set 2 (b). The graphs show the percentage of ants responding to the conditioned odour with the MaLER during six successive conditioning trials. Sample size (n) for each odour is indicated in parentheses. For single odours, curves represent the pooled performance of all groups in which a given odour was used as CS in experiment 1 (for more details about statistics, see Supplementary Information). For all single odours and binary mixtures of each odour set, ants reached the same level of conditioned responses in the last conditioning trial and their performance did not decay 1 h after training, as revealed by the memory test (shown as separate plot in the same graphs).

The ants' response to test odours revealed the occurrence of overshadowing. During the tests, ants trained with a binary mixture AB could in principle respond to A and B with the same level of responses reached by these components when trained alone, thus revealing an absence of overshadowing. Figure 2a shows an example in which the group trained with the mixture (OVS) responds to the components A and B in a similar way, and with levels

undistinguishable from those of the groups trained to the single components (*Ctrl A* and *Ctrl B*). Alternatively, ants could respond significantly less to one component than to the other (e.g. $B < A$), and less to this component than when it was learnt alone (the two criteria for defining overshadowing, see Introduction). Figure 2b shows an example in which overshadowing occurs as the response to component B of the *OVS* group is not only inferior to A but it is also inferior to the response to B of the *Ctrl B* group.

The 12 binary odour combinations of alcohols and aldehydes of sets 1 and set 2 are shown in Supplementary Table 1, together with the ketone used as novel odour for a generalisation control. The complete results obtained for each odour combination are shown in Supplementary Figs. 1-6. In all cases, the response to this ketone was low, thus showing a low generalization from the trained alcohols or aldehydes to the ketone. Overshadowing was found in 6 of the 12 combinations (Table 1), in which after AB training the response to one component was decreased compared to the other [either $R_A(AB) > R_B(AB)$ or $R_A(AB) < R_B(AB)$, with $R_X(Y)$ representing the responses to the odour X after training to the odour Y]. All these combinations also fulfilled the second criterion of overshadowing as the response to A or B after mixture training [$R_A(AB)$ or $R_B(AB)$] was lower than the response obtained after training to the single component in the corresponding control group [$R_A(A)$ or $R_B(B)$].

The dominance relationships found in the two sets of odours are summarized in Figure 3. Interestingly, the pattern emerging in both odour sets was similar despite the difference in chain length of the molecules tested. As odorants were equated in their vapour pressure through dilution in mineral oil (Supplementary Table 2), differences in concentration could not account for odour dominance in our experiments, although we cannot exclude possible difference in subjective (perceived) intensity. This result raises therefore the question of whether systematic rules accounting for overshadowing can be uncovered based on the odorant properties that varied in our experiment, namely carbon-chain length and functional group.

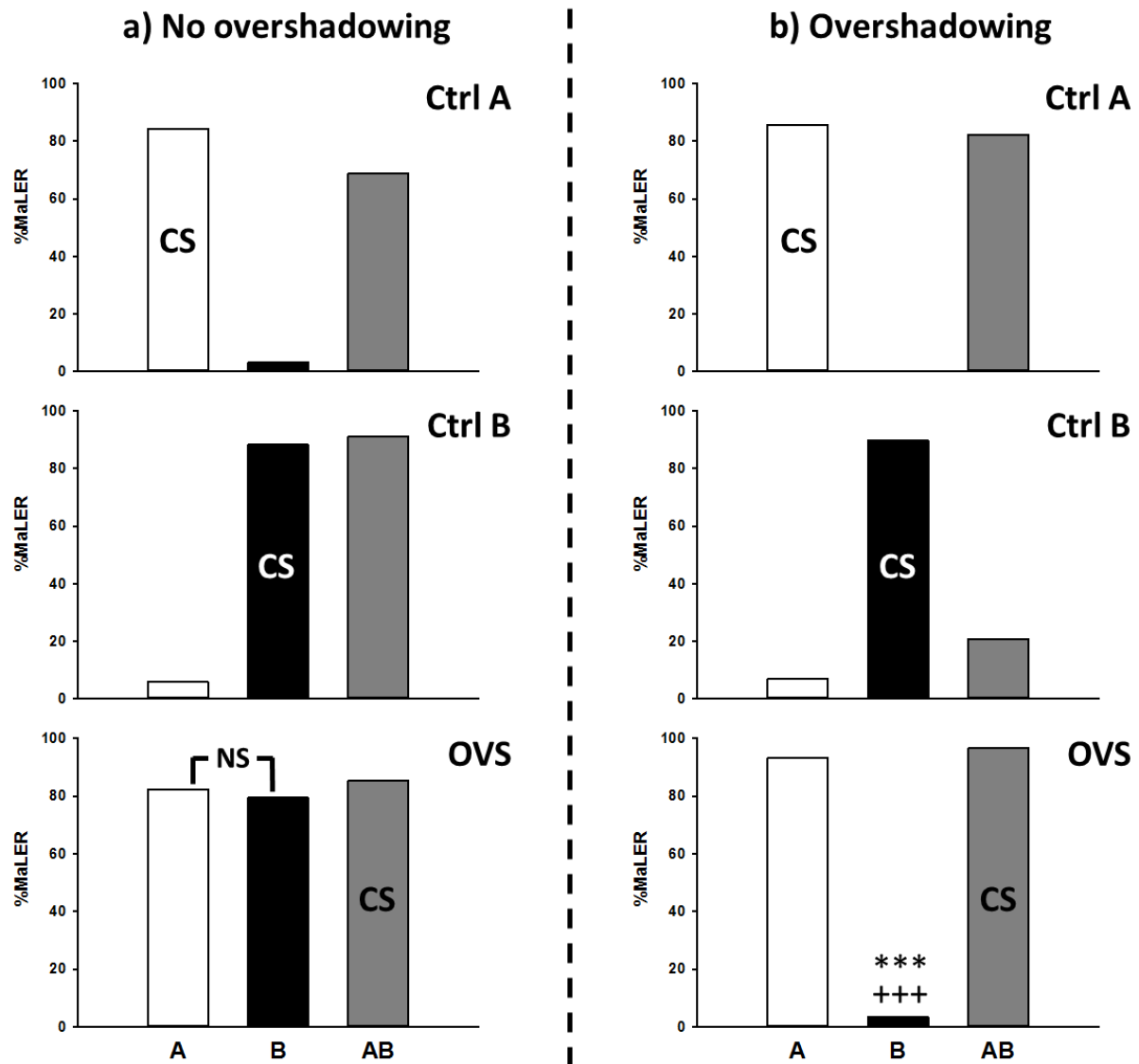


Figure 2: The case of overshadowing. Three groups of animals are trained independently, two with the single odours A and B (*Ctrl A* and *Ctrl B*, respectively), and one with the binary mixture AB (*OVS*) as conditioned stimulus (CS). The figure shows the percentage of ants responding to the conditioned odour with MaLER in a test performed 1 h after training. Each group was tested with A (white bar), B (black bar) and AB (grey bar). All groups responded highly to their respective CS. **a)** Example of absence of overshadowing: the *OVS* group responds equally to both components A and B of the mixture (example from the heptanol/nonanal combination, see Supplementary Fig 3b). **b)** Example of overshadowing: the *OVS* group responds significantly less to B than A (***) and responds also significantly less to B than after training to B alone (+++; see black bars of *Ctrl B* and *OVS*) (example from the octanol/octanal combination, see Supplementary Fig 6a). (NS) non-significant.

	Combination of odours (A / B)	Ctrl A			Ctrl B			OVS			R _A (AB) ≠ R _B (AB)	R _A (A) ≠ R _A (AB)	R _B (B) ≠ R _B (AB)	Overshadowing	
		n	R _A (A)	R _B (A)	n	R _B (B)	R _A (B)	n	R _{AB} (AB)	R _A (AB)	R _B (AB)	(p-value)	(p-value)		(p-value)
Set 1	hexanol / hexanal	29	96,55	27,59	27	96,30	11,11	28	92,86	64,71	47,06	< 0,001	0,35	< 0,001	A > B
	hexanol / octanol	26	84,62	23,08	25	84,00	28,00	29	82,76	62,07	82,76	0,23	0,08	1	A = B
	hexanol / octanal	31	77,42	6,45	31	80,65	9,68	34	73,53	47,06	64,71	0,15	<0,05	0,18	A = B
	hexanal / octanol	29	82,76	0,00	29	96,55	3,45	29	93,10	6,90	93,10	< 0,001	< 0,001	1	B > A
	hexanal / octanal	30	90,00	50,00	29	89,66	58,62	28	92,86	60,71	89,29	0,054 (t)	<0,05	1	A = B (?)
	octanol / octanal	28	85,71	0,00	29	89,66	6,90	29	96,55	93,10	3,45	< 0,001	0,42	<0,001	A > B
Set 2	heptanol / heptanal	29	93,10	0,00	29	93,10	24,14	29	93,10	96,55	3,45	< 0,001	1	<0,001	A > B
	heptanol / nonanol	29	72,41	17,24	28	78,57	35,17	28	85,71	67,86	78,57	0,50	0,78	1	A = B
	heptanol / nonanal	32	84,38	3,13	34	88,24	5,88	34	85,29	79,41	82,35	1	0,75	0,73	A = B
	heptanal / nonanol	33	63,64	3,03	32	81,25	3,13	32	87,50	0,00	68,75	<0,001	< 0,001	0,39	B > A
	heptanal / nonanal	29	89,66	27,59	29	93,10	75,86	28	82,14	64,29	78,57	0,27	<0,05	0,14	A = B (?)
	nonanol / nonanal	28	92,86	7,14	29	79,31	13,79	28	85,71	71,43	32,14	<0,05	0,08	<0,001	A > B

Table 1: Test responses and overshadowing criteria for odour combinations used in set 1 and set 2. The table shows, for each odour combination, the sample size (n) and the responses of the control groups (*Ctrl A* and *Ctrl B*) and of the group trained with the binary mixture (*OVS*) in the test performed 1 h after training. Values of $R_X(Y)$ represent the percentage of ants responding with MaLER to the odour X after training to the odour Y. A difference in responses to the mixture components of the *OVS* group [i.e. $R_A(AB)$ and $R_B(AB)$], first criterion for overshadowing determination, is indicated by adjusted p-values of pairwise response comparisons (sequential Bonferroni corrections after multiple McNemar's chi square tests). Fishers exact tests were used to compare responses to the mixture components of the *OVS* group with responses of the control groups to their training odour [i.e. $R_A(A)$ with $R_A(AB)$ and $R_B(B)$ with $R_B(AB)$] to assess the second criterion for overshadowing determination. Significant differences are indicated in bold. "X = Y": no overshadowing; "X > Y": X overshadowed Y (where X and Y are either A and B or B and A) as shown by the lower response to Y after mixture training and by the reduction of responses to Y after mixture training compared to responses to Y after Y training. "?" indicates difficulty in determining the occurrence of overshadowing due to high levels of generalization from the longer to the shorter aldehyde (further investigated in experiment 2). "t" indicates tendency (p approaching significance).

Uncovering the rules underlying overshadowing in olfactory mixtures. Three basic principles account for overshadowing in mixtures composed of two odours. 1) When odour components had the same carbon-chain length but varied in functional group (horizontal relationships in Fig. 3), alcohols always overshadowed aldehydes (e.g. hexanol overshadowed hexanal; Fig. 3, left panel). 2) When odour components had the same functional group but varied in carbon-chain length (vertical relationships in Fig. 3), no overshadowing occurred in the case of alcohols (e.g. no overshadowing between octanol and hexanol; Fig. 3, left panel). Overshadowing determination within aldehydes was difficult to ascertain since only one of the two criteria was fulfilled. 3) When odour components

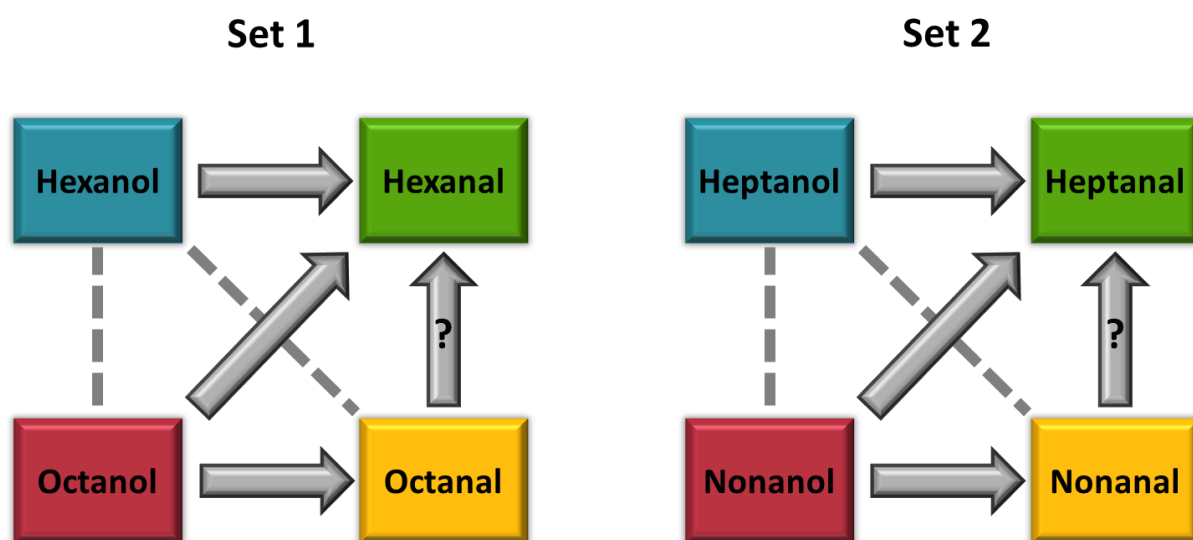


Figure 3: Relationships between odours used in set 1 (left panel) and set 2 (right panel). A solid arrow indicates the occurrence of overshadowing between the components of the mixture. A dotted line indicates the absence of overshadowing. “?” indicates the difficulty in determining the occurrence of overshadowing in this combination of odours due to high levels of generalization from the longer to the shorter aldehyde; the presence of solid arrows linking these odours is suggested by experiment 2. Similar patterns were found between the two sets of odours varying in carbon-chain length, thus indicating that common rules based both on functional group and carbon-chain length determine the occurrence of olfactory overshadowing in ants.

differed not only in carbon-chain length but also in functional group (diagonal relationships in Fig. 3), alcohols with longer carbon-chain length always overshadowed aldehydes with shorter chain length (e.g. octanol overshadowed hexanal; Fig. 3, left panel) whilst no overshadowing occurred between aldehydes with longer carbon-chain length and alcohols with a shorter chain length (e.g. no overshadowing between hexanol and octanal; Fig. 3, left panel).

The case of aldehydes: is overshadowing masked by generalization? An interesting finding was the high generalization found between aldehydes. Ants trained with an aldehyde (Supplementary Fig. 5, *Ctrl B* groups; octanal and nonanal) tended to respond not only to the trained odour in the test but also responded highly to the other aldehyde if it had a shorter carbon-chain length (Table 1 and Supplementary Fig. 5, *Ctrl B* groups, hexanal and heptanal). This particular situation raises a problem for the analysis of overshadowing after mixture training. Indeed, in a mixture of two aldehydes differing in carbon-chain length, overshadowing could be masked by the high generalization from the longer to the shorter molecule. For instance, a high generalization from nonanal to heptanal is evident after nonanal training so that responses to both odours did not differ ($p_{\text{corr}}=0.22$; Table 1 and Supplementary Fig. 5, right, *Ctrl B* group). This result renders the responses of the *OVS* group difficult to interpret: while the responses to nonanal and heptanal (resp. octanal and hexanal) did not differ significantly after training to the mixture of these two odours (Table 1 and Supplementary Fig. 5, *OVS* groups), the response to heptanal (resp. hexanal) was nevertheless significantly lower after mixture training than after heptanal (resp. hexanal) training (Table 1, compare heptanal and hexanal responses of *Ctrl A* and *OVS* groups). Therefore, in the case of aldehydes, only one criterion of overshadowing determination was fulfilled. Was overshadowing masked by the high generalization from longer to shorter aldehydes?

To answer this question we performed a second experiment using three aldehydes varying in carbon-chain length (hexanal, octanal and nonanal), a chemical feature that significantly influences olfactory generalization^{30,34}. In the previous experiments, aldehydes differed by two carbons in each combination; here we used two other combinations to create a difference in chain length of 1 carbon (octanal/nonanal) and of 3 carbons (hexanal/nonanal). The results obtained with these combinations were compared to those of

the heptanal/nonanal combination differing in 2 carbons. We predicted that generalization should be higher in the first combination (octanal/nonanal) due to the higher structural similarity in carbon number, while it should be lower in the second combination (hexanal/nonanal) due to the higher dissimilarity. As a consequence, overshadowing should be visible only in the second case, where it would not be masked by generalization.

Indeed, overshadowing was only found in the hexanal/nonanal combination as after mixture training the response to hexanal was lower than the response to nonanal and the response to hexanal was lower after mixture training than that after hexanal training (Table 2). By contrast, none of these criteria was fulfilled after octanal/nonanal training so that no overshadowing was visible. The results obtained for these two odour combinations are shown in Supplementary Fig 7. As in experiment 1, in both odour combinations the response to the novel odour (a ketone) was low. As predicted, generalization was

Combination of odours (A / B)	<i>Ctrl A</i>		<i>Ctrl B</i>		<i>OVS</i>			$R_A(AB) \neq R_B(AB)$	$R_A(A) \neq R_A(AB)$	$R_B(B) \neq R_B(AB)$	Overshadowing
	$R_A(A)$	$R_B(A)$	$R_B(B)$	$R_A(B)$	$R_{AB}(AB)$	$R_A(AB)$	$R_B(AB)$	(p-value)	(p-value)	(p-value)	
hexanal / nonanal	93,10	13,79	96,30	11,11	100,00	17,24	96,55	<0,001	<0,001	1	B > A
heptanal / nonanal	89,66	27,59	93,10	75,86	82,14	64,29	78,57	0,27	<0,05	0,14	A = B
octanal / nonanal	85,71	67,86	96,55	86,21	92,86	96,43	100,00	1,00	0,35	1	A = B

Table 2: Test responses and overshadowing criteria for aldehyde combinations used in experiment 2. The table shows, for each odour combination, the sample size (n) and the responses of the control groups (*Ctrl A* and *Ctrl B*) and of the group trained with the mixture (*OVS*) in the test performed 1 h after training. Values of $R_X(Y)$ represent the percentage of ants responding with the *Maxilla-Labium* extension response to the odour X after training to the odour Y. A difference in responses to the mixture components of the *OVS* group [i.e. $R_A(AB)$ and $R_B(AB)$], first criterion for overshadowing determination, is indicated by adjusted p-values of pairwise response comparisons (sequential Bonferroni corrections after multiple McNemar's chi square tests). Fishers exact tests were used to compare responses to the mixture components of the *OVS* group with responses of the control groups to their training odour [i.e. $R_A(A)$ with $R_A(AB)$ and $R_B(B)$ with $R_B(AB)$] to assess the second criterion for overshadowing determination. Response levels and statistical differences of the heptanal/nonanal combination are extracted from Experiment 1 (see Table 1). Significant differences are indicated in bold. "X = Y": no overshadowing; "X > Y": X overshadowed Y (where X and Y are either A and B or B and A) as shown by the lower response to Y after mixture training and by the reduction of responses to Y after mixture training compared to responses to Y after Y training. "?" indicates difficulty in determining the occurrence of overshadowing due to high levels of generalization from nonanal to heptanal and from nonanal to octanal.

inversely proportional to the difference in carbon-chain length (Fig. 4, blue curve). It was higher from nonanal to octanal, differing in only 1 carbon (89.29%) while it was lower from nonanal to hexanal, differing in 3 carbons (11.54%). In addition, the difference between the responses to the components after mixture training (amount of overshadowing) increased with component dissimilarity (Fig. 4, red curve; higher in hexanal/nonanal and lower in octanal/nonanal). Therefore, the higher the generalization from nonanal to the other aldehyde, the lower the amount of overshadowing. Taken together, our results suggest that longer aldehydes overshadow shorter aldehydes so that it is very likely that nonanal overshadowed heptanal and that octanal overshadowed hexanal but the effect was masked by generalization (Fig. 3).

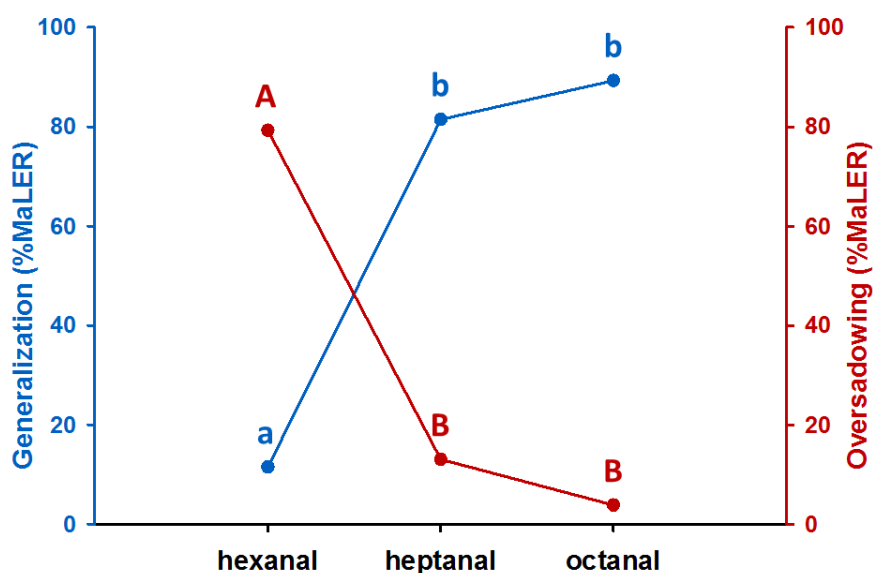


Figure 4: Generalization and overshadowing in aldehydes depending on carbon-chain length. The blue y-axis shows the percentage of ants responding with MaLER to hexanal, heptanal and octanal after nonanal training (i.e. the level of generalization from nonanal to the other aldehydes). The red y-axis represents the difference in the %MaLER of ants responding to nonanal and to the other aldehyde to which it has been combined (hexanal, heptanal or octanal) after mixture training (i.e. the amount of overshadowing). A significant carbon-chain length effect is visible for generalization, which increases when aldehydes are less different in their carbon-chain length ($\chi^2=27.76$; $p<0.001$). A significant effect is also visible for the amount of overshadowing, which decreases when aldehydes are less different in their carbon-chain length ($\chi^2=29.14$; $p<0.001$). Thus, for the aldehydes tested, the higher the generalization, the lower the amount of overshadowing. Different letters indicate significant differences (sequential Bonferroni corrections after multiple GLMMs).

Discussion

In the present study we investigated olfactory overshadowing in ants with the goal of determining how animals perceive and learn complex olfactory blends. In this way, we aimed at providing new insights into the phenomenon of overshadowing, which has been reported in various species on a stimulus-specific basis and without the enunciation of general rules accounting for it. Here, taking into account the two criteria defining olfactory overshadowing, we report a systematic analysis of this phenomenon in ants, for which odour cues and signals play a fundamental role in different aspects of their natural life (e.g., floral odours when foraging, signature mixtures in nestmate recognition)²². Our results clearly show that overshadowing critically depends on the combination of at least two parameters investigated in this study: the functional group and the carbon-chain length³⁴. Our results thus indicate that olfactory overshadowing obeys specific rules, even in our reduced set of tested odours. Using two comparable sets of odours composed by alcohols and aldehydes that differed or not in carbon-chain length (difference of 0 or 2 carbons), we reveal that (1) overshadowing does not occur in binary mixtures composed by two alcohols; (2) aldehydes with long carbon-chain length overshadow aldehydes with shorter carbon-chain length; (3) alcohols overshadow aldehydes with shorter or equal carbon-chain length.

Our results showed the occurrence of numerous cases of overshadowing among the binary mixtures tested. This shows that this phenomenon is not sporadic³⁰ but is widespread in the olfactory perception of ants. Even if we tested only binary mixtures of a reduced set of odour components, this recurrence suggests that, when confronted to a complex olfactory blend, ants would not perceive, learn or retrieve the presence of all blend components but rather guide their choices based on one or few key, dominant components, acting as overshadowing stimuli. As a consequence, the mixture would be reduced to its key components, thereby reducing the necessity of taking into account all the multiple components constituting the olfactory stimulus.

The chemical proprieties of the odours composing the mixture determine their role as either overshadowing or overshadowed component, depending also on the properties of the component with which they are mixed. For instance, octanal overshadowed hexanal but was overshadowed by octanol (Fig. 3). This is in accordance with a recent finding in

honeybees showing that a dominant odorant (key odorant) in a given complex mixture of 14 odorants was not necessarily a dominant odorant in another complex mixture³⁵.

When binary mixtures are composed of two aldehydes, overshadowing could be masked by the high level of generalization existing between odorants belonging to this functional group. Previous studies have shown that generalization depends on the degree of structural similarity between odours in terms of functional group^{30,34,36,37} and carbon-chain length³⁴. High levels of generalization, and a negative correlation between discrimination and the similarity in the number of carbons are well-known phenomena that have been described for aldehydes in bees^{34,38}, rats³⁹ and humans³⁷. In ants, decreasing the difference in the number of carbons between aldehydes resulted also in an increase of generalization between odours (Fig. 4). This, in turn, masks overshadowing as no dominant odour could be defined in a binary mixture where both components would be treated equally due to high generalization levels.

Generally, overshadowing is thought to result from differences in stimulus salience^{7,8}, a factor that can be revealed by differences in component learning¹⁰. However, in our study, the learning efficiency of the components (acquisition level in the last conditioning trial) did not account for overshadowing as all single odours were equally learnt, and the test responses one hour after conditioning were the same (Fig. 1a,b upper panels). Furthermore, the difference in learning rate did not reflect component dominance. For instance, learning of octanol was slower than that of octanal (see Supplementary Information for detailed analyses of odour learning curves), yet the former overshadowed the latter (Fig. 3). This is in agreement with studies in bees showing that differences in odour learning do not account for olfactory dominance in complex mixtures^{35,40}.

A recent study showed that *Camponotus aethiops* trained to 15 binary mixtures responded either equally well to both components or more to one component than to the other³⁰. Thus, for some mixtures (3 out of the 15 tested) the first criterion for overshadowing was shown. Yet, this study did not compare the response to the dominated component after mixture training to that after component training (i.e. the second criterion of overshadowing). Interestingly, in the three cases revealing a difference in the response to odour components, mixtures were composed by an alcohol and an aldehyde (one case), or

by an alcohol and a secondary ketone (two cases). The alcohol was always the dominant odorant and its chain length was either equal (two cases) or longer (one case) than the dominated odorant, which is in agreement with our findings.

In honeybees, training with binary mixtures composed by an aldehyde and an alcohol of equal carbon-chain length (i.e. hexanal+hexanol and octanal+octanol) resulted in the dominance of the aldehyde over the alcohol¹⁴, contrarily to our results, showing the opposite trend. However, one possible difference between our study and this honeybee study is that the vapour pressure of the odours was not normalized. Odour dominance in a mixture also depends on component concentration, with more concentrated odours dominating less concentrated ones^{12,35}. Thus, the higher volatility of aldehydes with respect to alcohols having the same carbon-chain length (see Supplementary Table 2) could account for the results of the bee study and explain the discrepancy with our work.

Overshadowing, as detected in our study, could result from interactions both at the peripheral and central levels of odour processing. At the peripheral level, overshadowing could result from the competition of mixture components for olfactory receptor (OR) binding sites^{41–43}. Indeed, most ORs are broadly tuned to specific olfactory ligands and are sensitive to structural similarity⁴⁴, thus syntopic interactions (either agonist or antagonist competitions at the OR binding site)^{45,46} could account for overshadowing. At the central level, olfactory stimuli are first processed in the antennal lobes (ALs), the primary olfactory neuropil in the insect brain. In ants, each AL consists of several hundreds of glomeruli (around 450 glomeruli have been identified in worker carpenter ants^{31,47–49}). Glomeruli are functional units receiving input from olfactory receptor neurons (ORNs) and conveying the information to higher-order structures such as the mushroom bodies (MB) via projection neurons (PNs). Glomeruli interact through local interneurons (LNs) that are mostly inhibitory. Imaging studies have shown that the glomerular activity pattern of binary mixtures at the AL input level is similar to the combination of the patterns evoked by the mixture components^{50–54}. Interestingly, in the honeybee, the mixture activity pattern is always more similar to that of the stronger component (i.e. the one which activated the higher number of glomeruli)⁵¹. Thus, overshadowing could result from the fact that the overshadowing component activates a higher number of glomeruli in the AL than the overshadowed one. At the output of the AL, mixture representation is less similar to the mere sum of its components^{53–55}. This indicates that olfactory processing within the AL

network increases the uniqueness (holistic processing) of the mixture. Mixture interactions at the AL input and output levels are thought to result from the action of LNs. These interneurons are thus good candidates as mediators or facilitators of overshadowing. By reducing the level of activation of some glomeruli, LNs could sharpen the mixture representation so that this representation becomes more similar to representation of one component (the overshadowing one) than to that of the other component (the overshadowed one). Furthermore, feedbacks from MB to AL⁵⁶ could also modulate the mixture representation in the AL.

We hypothesize that in the cases where overshadowing occurs, the representation of the binary mixture in the AL should be more similar to the overshadowing component than to the overshadowed one; whereas in the cases of absence of overshadowing the representation of the binary mixture in the AL should be more similar to the combination of both components. This hypothesis is based on findings in rats³⁹ and bees³⁴ showing that perceptual similarity of single odours can be predicted from the similarities in the neural response evoked by these odours in the primary olfactory centre: the AL in insects and the olfactory bulb in vertebrates. Thus, the high generalization level between the binary mixture and the overshadowing component and the low generalization level from the overshadowed component to the mixture should translate in terms of similarity in glomerular activity pattern. Since olfactory learning modifies odour representation in the AL^{57–59}, it is conceivable that the neural representation of the mixture becomes more similar to that of the overshadowing component along successive trials.

Moreover, it is possible that overshadowing does not occur exclusively at the level of AL processing but involves also higher order brain structures such as the MB or the lateral horn. Odorant salience could be modulated at these levels, therefore determining odour-dominance relationships beyond the olfactory coding occurring in the AL. Further studies on olfactory mixture processing using electrophysiological and optophysiological recording techniques recently developed in ants^{23,31,32,60–63} will contribute to our understanding of how olfactory mixtures are perceived by insects, and whether overshadowing results from interactions at the peripheral and/or central levels and/or from a learning-induced variation in odour representation in the AL.

Methods

Study organism. Seventeen colonies of *Camponotus aethiops* were collected in May 2012 and April 2013 at Pompertuzat (Midi-Pyrénées, France, latitude 43.5°, longitude 1.516667°) and kept in the laboratory (25°C, light-dark cycle= 12:12, 70% humidity) in artificial nests composed of two plastic boxes connected by a plastic hose. One of the boxes was covered by cardboard and contained a plaster floor to form the nest; the other box, exposed to light constituted the foraging arena. The inner sides of the two boxes were coated with Fluon® to prevent ants from escaping. Ants were fed twice a week with carbohydrates, protein and vitamins⁶⁴; water was provided *ad libitum*. Three weeks before the onset of the experiment, the ants were deprived of sucrose to increase their appetitive motivation for sucrose reward during conditioning; mealworms (protein) and water were still provided *ad libitum*.

Handling. Medium sized workers collected in the foraging arena were kept in glass vials and cooled on ice during 10 min until they stopped moving. Each ant was then harnessed in an individual holder made of a 0.2 ml Eppendorf® tube from which the tip was removed. The head of the ant was passed through the apical hole and a strip of adhesive tape was placed between the head and the thorax to prevent body movements (Supplementary Fig. 8). The antennae and mouthparts could, nevertheless, freely move²⁶. Ants were then left for 3h to recover from anaesthesia and habituate to harnessing conditions.

Stimuli. In the first experiment, two sets of four odours (set 1: hexanol, hexanal, octanol, octanal; set 2: heptanol, heptanal, nonanol, nonanal, Sigma Aldrich, France) and their binary mixtures (6 binary mixtures by set of odours, 12 in total) were used as conditioning stimuli (CS). Odours differed in their functional group (alcohols and aldehydes) and chain length (set 1: 6 vs. 8 carbons; set 2: 7 vs. 9 carbons).

In the second experiment, three aldehydes (hexanal, octanal and nonanal) and two binary mixtures (hexanal + nonanal and octanal + nonanal), which were not tested in experiment 1, were used as conditioning stimuli (CS). Odours differed only in their carbon-chain length (6, 8 and 9 carbons).

In both experiments, an additional odour (C) was used in the test performed after conditioning in order to measure the tendency to generalise olfactory responses to a novel

odour. The four novel odours used differed from the CS in their functional group (ketones) (see Supplementary Table 1).

Vapour pressures of all odours were standardized by diluting the pure substances in mineral oil (see Supplementary Table 2). Six microliters of single odour or binary mixture were applied onto a 1cm² piece of filter paper, which was inserted into a plastic 10 ml syringe used to stimulate the ants. The unconditioned stimulus (US) was 50% sucrose solution (w/w).

Experimental design. Ants were subjected to Pavlovian conditioning of the *Maxilla-Labium* extension response (MaLER)²⁶. Three groups of ants were conditioned in parallel for each combination of two odours A and B: one group was conditioned to the binary mixture AB (OVS group) while the other two control groups were conditioned to the odour components (A and B for *Ctrl A* and *Ctrl B* groups, respectively). Conditioning consisted in six consecutive trials of paired CS-US presentation. Each trial lasted 1min. Twenty-five seconds after placing the ant under a binocular, the CS was presented at 2cm of the antennae by blowing an air puff during 5s; a sucrose droplet eliciting the MaLER was presented during 5s during which individuals were allowed to drink the solution. Sucrose delivery started 3s after odour onset thus defining a CS-US overlap of 2s. The ant was then left during 27s in the conditioning set-up in order to avoid context learning. Because 15 ants were trained in a row, the inter-trial interval (ITI) was 15min. An air extractor was placed behind the ant in order to remove undesired odour stimuli. Individuals that did not respond at least three times to the US were discarded (1.46% of the tested individuals).

One hour after training, the three groups (OVS group, *Ctrl A* and *Ctrl B* group) were tested with the binary mixture AB, each of the odour components A and B and a novel odour C in the absence of reward. Each odour was presented during 5s and the sequence of odour presentation was random. Similarly to training trials, each test lasted 1min, resulting in an ITI of 15min. Mortality rate during the experiments was of 2.76%.

Data analysis. All statistical analyses were performed with R-2.15.0. Upon odour presentation, the response of the ants was scored as 1 when MaLER was visible and 0 otherwise. The percentage of conditioned responses was then calculated.

Generalized linear mixed models (GLMM, package lme4⁶⁵) with a binomial error structure (logit-link) were used to analyse learning efficiency, measured in terms of the % of conditioned responses reached in the last conditioning trial in the case of single substances and binary mixtures of set 1 and set 2. The ant's response was used as response variable, the colony of origin was included as random factor in order to adjust for colony origin, and the last trial constituted the subset of data.

Comparisons between single odours and binary mixtures within each set were tested by including the odour composition (single and binary) as fixed factor, the colony of origin as random factors and the odour set as subset of data. A single odour has been conditioned in three different odour combinations (e.g. hexanol has been conditioned when studying overshadowing in odour combinations hexanol/hexanal, hexanol/octanol and hexanol/octanal). Because the three different odour combinations containing the same single odour could have been studied at different moments of the year, we included the odour combination as random factor to adjust for a potential seasonal effect on the colonies' state and thus on learning abilities.

Differences between set 1 and set 2 for single odours and binary mixtures were revealed by coding the set as fixed factor, the odour combination (for single substances) and the colony of origin as random factor and the odour composition (single or binary) as subset of data.

Differences in the ants' response to the conditioned odour (single odours or binary mixture) between the last trial of the conditioning and the test were detected by means of a McNemar's Chi Square test.

The responses of each group (*OVS* group, *Ctrl A* and *Ctrl B*) to the four odours tested (A, B, AB and C) one hour after conditioning, were compared with Cochran's Q tests. Multiple McNemar's Chi Square tests (with sequential Bonferroni corrections) were applied for pairwise comparisons between test odours. For instance for the *OVS* group, these tests were applied to compare the responses to A, B, AB and C after mixture training. A difference in the response to A and B of this group (that is a difference between $R_A(AB)$ and $R_B(AB)$, see Table 1) was used as a criterion for overshadowing. Furthermore, we used Fisher's Exact Test to compare the response to the mixture components of the *OVS* group [e.g. $R_A(AB)$] with

that of the control group trained to the component considered [e.g. $R_A(A)$] (see Table 1). This additional comparison constitutes the second criterion for determining the occurrence of overshadowing.

In experiment 2, to ensure that in the test we analysed a true generalization response from nonanal to the other aldehydes (hexanal, heptanal or octanal), we only kept ants that successfully learnt nonanal (*Ctrl/ B* group) in each odour combination (96.30; 93.10 and 96.55% of ants respectively for odour combination hexanal/nonanal, heptanal/nonanal and octanal/nonanal). To test whether the level of generalization from nonanal to the other aldehyde was dependent on the carbon-chain length of the other aldehyde (6, 7 and 8 respectively) we used a GLMM with a binomial error structure (logit-link). The ant's response to the other aldehyde was used as response variable; the carbon-chain length of the other aldehyde was included as fixed factor and the colony of origin as random factor. Post-hoc differences were revealed by applying the same GLMMs to the respectively reduced set of data and adjusting the p-values with sequential Bonferroni corrections.

As for generalization, to ensure that in the test we analysed a true “overshadowing response”, we only kept ants that had successfully learnt the mixture of nonanal and the other aldehyde (*OVS* group; 100; 82.14 and 92.86% respectively for odour combination hexanal/nonanal, heptanal/nonanal and octanal/nonanal). For each ant, we calculated an “overshadowing response” by subtracting its response to the other aldehyde from its response to nonanal. As no ant of the *OVS* group responded to the other aldehyde without responding to nonanal, the “overshadowing response” was 0 (ants that did not respond to any of the components or that responded to both components) or 1 (ants that responded only to nonanal).

A GLMM with a binomial error structure (logit-link) was used to test whether the amount of overshadowing between nonanal and the other aldehyde depended on the carbon-chain length of the aldehyde mixed with nonanal. The “overshadowing response” (see above) was used as response variable; the carbon-chain length of the other aldehyde was included as fixed factor and the colony of origin as random factor. Post-hoc differences were revealed by applying the same GLMMs to the respectively reduced set of data and adjusting the p-values with sequential Bonferroni corrections.

Acknowledgments

This work was supported by a Marie Curie Reintegration Grant (Identity Code, FP7-MC-ERG-2009-256524 to PdE) and the CNRS research network GDR 2822 Ethologie. M.G. thanks the Institut Universitaire de France. We thank S.R. Tedjakumala for useful comments on the Figure 3.

Author contributions

M.G., P.d.E and M.P designed research; M.P. performed research and analysed data; M.P., M.G and P.d.E wrote the paper.

References

1. Gottfried, J. A. Central mechanisms of odour object perception. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 628–641 (2010).
2. Thomas-Danguin, T. *et al.* The perception of odor objects in everyday life: a review on the processing of odor mixtures. *Cogn. Sci.* **5**, 504 (2014).
3. Breed, M. D., Diaz, P. H. & Lucero, K. D. Olfactory information processing in honeybee, *Apis mellifera*, nestmate recognition. *Anim. Behav.* **68**, 921–928 (2004).
4. Snitz, K. *et al.* Predicting Odor Perceptual Similarity from Odor Structure. *PLoS Comput Biol* **9**, e1003184 (2013).
5. Raguso, R. A. Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **39**, 549–569 (2008).
6. Pavlov, I. *Conditioned reflexes an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.* (Oxford University Press, London, 1927).
7. Kamin, L. J. in *Miami symposium on the prediction of behavior: Aversive stimulation* [9–31] (University of Miami Press, Miami, 1968).
8. Kamin, L. J. in *Fundamental Issues in Associative Learning* [Mackintosh, N. J. & Honig, W. K. (ed.)] [42–64] (Dalhousie University Press, Halifax, 1969).
9. Kamin, L. in *Punishment and aversive behavior* [Campbell, B. A. & Church, R. M. (ed.)] [279–296] (Appleton-Century-Crofts, New York, 1969).
10. Rescorla, R. & Wagner, A. in *Classical Conditioning II: Current Research and Theory* [64–99] (Appleton-Century-Crofts, New York, 1972).
11. Mackintosh, N. J. A theory of attention: Variations in the associability of stimuli with reinforcement. *Psychol. Rev.* **82**, 276–298 (1975).
12. Kay, L. M., Crk, T. & Thorngate, J. A redefinition of odor mixture quality. *Behav. Neurosci.* **119**, 726–733 (2005).
13. Derby, C. D., Hutson, M., Livermore, B. A. & Lynn, W. H. Generalization among related complex odorant mixtures and their components: analysis of olfactory perception in the spiny lobster. *Physiol. Behav.* **60**, 87–95 (1996).
14. Smith, B. H. & Cobey, S. The olfactory memory of the honeybee *Apis mellifera*. II. Blocking between odorants in binary mixtures. *J. Exp. Biol.* **195**, 91–108 (1994).
15. Smith, B. H. The role of attention in learning about odorants. *Biol. Bull.* **191**, 76–83 (1996).
16. Pelz, C., Gerber, B. & Menzel, R. Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *J. Exp. Biol.* **200**, 837–847 (1997).
17. Linster, C. & Smith, B. H. A computational model of the response of honey bee antennal lobe circuitry to odor mixtures: overshadowing, blocking and unblocking can arise from lateral inhibition. *Behav. Brain Res.* **87**, 1–14 (1997).

18. Smith, B. H. Analysis of interaction in binary odorant mixtures. *Physiol. Behav.* **65**, 397–407 (1998).
19. Smith, B. H. & Getz, W. M. Nonpheromonal Olfactory Processing in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* **39**, 351–375 (1994).
20. Martin, J. P. *et al.* The neurobiology of insect olfaction: Sensory processing in a comparative context. *Prog. Neurobiol.* **95**, 427–447 (2011).
21. Sandoz, J. C. Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. *Front. Syst. Neurosci.* **5**, 98 (2011).
22. Hölldobler, B. & Wilson, E. O. *The Ants*. (Belknap Press, Cambridge, 1990).
23. Galizia, Menzel & Holldobler. Optical imaging of odor-evoked glomerular activity patterns in the antennal lobes of the ant *Camponotus rufipes*. *Naturwissenschaften* **86**, 533–537 (1999).
24. Dupuy, F., Sandoz, J.-C., Giurfa, M. & Josens, R. Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Anim. Behav.* **72**, 1081–1091 (2006).
25. Josens, R., Eschbach, C. & Giurfa, M. Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants. *J. Exp. Biol.* **212**, 1904–1911 (2009).
26. Guerrieri, F. J. & d' Ettore, P. Associative learning in ants: conditioning of the *maxilla-labium* extension response in *Camponotus aethiops*. *J. Insect Physiol.* **56**, 88–92 (2010).
27. Guerrieri, F. J., d' Ettore, P., Devaud, J.-M. & Giurfa, M. Long-term olfactory memories are stabilised via protein synthesis in *Camponotus fellah* ants. *J. Exp. Biol.* **214**, 3300–3304 (2011).
28. Van Wilgenburg, E. *et al.* Learning and discrimination of cuticular hydrocarbons in a social insect. *Biol. Lett.* **8**, 17–20 (2012).
29. Bos, N. *et al.* Learning and perceptual similarity among cuticular hydrocarbons in ants. *J. Insect Physiol.* **58**, 138–146 (2012).
30. Bos, N., d' Ettore, P. & Guerrieri, F. J. Chemical structure of odorants and perceptual similarity in ants. *J. Exp. Biol.* **216**, 3314–3320 (2013).
31. Zube, C., Kleineidam, C. J., Kirschner, S., Neef, J. & Rössler, W. Organization of the olfactory pathway and odor processing in the antennal lobe of the ant *Camponotus floridanus*. *J. Comp. Neurol.* **506**, 425–441 (2008).
32. Dupuy, F., Josens, R., Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. Calcium imaging in the ant *Camponotus fellah* reveals a conserved odour-similarity space in insects and mammals. *BMC Neurosci.* **11**, 28 (2010).
33. Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J. & Ståhl, B. Diversity and distribution of floral scent. *Bot. Rev.* **72**, 1–120 (2006).
34. Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M. Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol.* **3**, e60 (2005).
35. Reinhard, J., Sinclair, M., Srinivasan, M. V. & Claudianos, C. Honeybees learn odour mixtures via a selection of key odorants. *PLoS One* **5**, e9110 (2010).
36. Smith, B. H. & Menzel, R. The use of electromyogram recordings to quantify odourant discrimination in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* **35**, 369–375 (1989).

37. Laska, M. & Teubner, P. Olfactory discrimination ability for homologous series of aliphatic alcohols and aldehydes. *Chem. Senses* **24**, 263–270 (1999).
38. Laska, M., Galizia, C. G., Giurfa, M. & Menzel, R. Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees. *Chem. Senses* **24**, 429–438 (1999).
39. Linster, C. & Hasselmo, M. E. Behavioral responses to aliphatic aldehydes can be predicted from known electrophysiological responses of mitral cells in the olfactory bulb. *Physiol. Behav.* **66**, 497–502 (1999).
40. Laloi, D. *et al.* Recognition of complex odors by restrained and free-flying honeybees, *Apis mellifera*. *J. Chem. Ecol.* **26**, 2307–2319 (2000).
41. Akers, R. P. & Getz, W. M. Response of olfactory receptor neurons in honeybees to odorants and their binary mixtures. *J. Comp. Physiol. A* **173**, 169–185 (1993).
42. Duchamp-Viret, P., Duchamp, A. & Chaput, M. A. Single olfactory sensory neurons simultaneously integrate the components of an odour mixture. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 2690–2696 (2003).
43. Chaput, M. A. *et al.* Interactions of odorants with olfactory receptors and receptor neurons match the perceptual dynamics observed for woody and fruity odorant mixtures. *Eur. J. Neurosci.* **35**, 584–597 (2012).
44. Hallem, E. A. & Carlson, J. R. Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* **125**, 143–160 (2006).
45. Rospars, J.-P., Lansky, P., Chaput, M. & Duchamp-Viret, P. Competitive and noncompetitive odorant interactions in the early neural coding of odorant mixtures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 2659–2666 (2008).
46. Münch, D., Schmeichel, B., Silbering, A. F. & Galizia, C. G. Weaker ligands can dominate an odor blend due to syntopic interactions. *Chem. Senses* **38**, 293–304 (2013).
47. Zube, C. & Rössler, W. Caste- and sex-specific adaptations within the olfactory pathway in the brain of the ant *Camponotus floridanus*. *Arthropod Struct. Dev.* **37**, 469–479 (2008).
48. Mysore, K. *et al.* Caste and sex specific olfactory glomerular organization and brain architecture in two sympatric ant species *Camponotus sericeus* and *Camponotus compressus* (Fabricius, 1798). *Arthropod Struct. Dev.* **38**, 485–497 (2009).
49. Nishikawa, M. *et al.* Sexual dimorphism in the antennal lobe of the ant *Camponotus japonicus*. *Zoolog. Sci.* **25**, 195–204 (2008).
50. Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C. G. & Menzel, R. Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* **387**, 285–288 (1997).
51. Deisig, N., Giurfa, M., Lachnit, H. & Sandoz, J.-C. Neural representation of olfactory mixtures in the honeybee antennal lobe. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 1161–1174 (2006).
52. Carlsson, M. A., Chong, K. Y., Daniels, W., Hansson, B. S. & Pearce, T. C. Component information is preserved in glomerular responses to binary odor mixtures in the moth *Spodoptera littoralis*. *Chem. Senses* **32**, 433–443 (2007).
53. Silbering, A. F. & Galizia, C. G. Processing of odor mixtures in the *Drosophila* antennal lobe reveals both global inhibition and glomerulus-specific interactions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 11966–11977 (2007).

54. Kuebler, L. S., Schubert, M., Kárpáti, Z., Hansson, B. S. & Olsson, S. B. Antennal lobe processing correlates to moth olfactory behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 5772–5782 (2012).
55. Deisig, N., Giurfa, M. & Sandoz, J. C. Antennal lobe processing increases separability of odor mixture representations in the honeybee. *J. Neurophysiol.* **103**, 2185–2194 (2010).
56. Heisenberg, M. What do the mushroom bodies do for the insect brain? an introduction. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* **5**, 1–10 (1998).
57. Faber, T., Joerges, J. & Menzel, R. Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat. Neurosci.* **2**, 74–78 (1999).
58. Yu, D., Ponomarev, A. & Davis, R. L. Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning; memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron* **42**, 437–449 (2004).
59. Fernandez, P. C., Locatelli, F. F., Person-Rennell, N., Deleo, G. & Smith, B. H. Associative conditioning tunes transient dynamics of early olfactory processing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 10191–10202 (2009).
60. Ozaki, M. *et al.* Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* **309**, 311–314 (2005).
61. Yamagata, N., Nishino, H. & Mizunami, M. Pheromone-sensitive glomeruli in the primary olfactory centre of ants. *Proc. Biol. Sci.* **273**, 2219–2225 (2006).
62. Brandstaetter, A. S., Rössler, W. & Kleineidam, C. J. Friends and foes from an ant brain's point of view--neuronal correlates of colony odors in a social insect. *PloS One* **6**, e21383 (2011).
63. Brandstaetter, A. S. & Kleineidam, C. J. Distributed representation of social odors indicates parallel processing in the antennal lobe of ants. *J. Neurophysiol.* **106**, 2437–2449 (2011).
64. Bhatkar, A. & Whitcomb, W. H. Artificial diet for rearing various species of ants. *Fla. Entomol.* **53**, 229 (1970).
65. Bates, D., Maechler, M. & Bolker, B. *lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and R syntax*. (2011). R package version 0.999999-0.

Supplementary Information

Statistical analyses for learning curves of single odours and binary mixtures

Differences in acquisition between single odours or between binary mixtures within each odour set were tested using generalized linear mixed models (GLMM, package lme4¹) with a binomial error structure (logit-link). The ant's *maxilla-labium* extension response (MaLER)², scored 0 or 1, was used as response variable. Trials were used as predictor variable (covariate), the odour as fixed factor and individuals and colony of origin as random factors in order to account for repeated measurements and adjust for colony origin. Each single odour was conditioned in three different odour combinations (e.g. hexanol has been conditioned in combinations hexanol/hexanal, hexanol/octanol and hexanol/octanal). Because the three combinations containing the same single odour were in some cases tested at different times of the year, we included odour combination as random factor to adjust for a potential seasonal effect on the colonies' state and on learning abilities. Post-hoc differences between single odours or binary mixtures within each set were revealed by applying the same GLMMs to the respectively reduced set of data, and adjusting the p-value with sequential Bonferroni correction.

Ants efficiently learnt the odour-sucrose association, both in the case of single odours and binary mixtures, and exhibited a high level (approximately 85%) of conditioned responses in the last training trial (see main text, Fig. 1). However, we found a significant interaction between trials and odour in the case of single substances in set 2 ($\chi^2=7.83$; $p<0.05$), indicating that acquisition rates varied among single odours. We also observed a significant effect of odour in set 1 (single odours: $\chi^2=18.87$; $p<0.001$; binary mixtures: $\chi^2=11.26$; $p<0.05$) and for single odours in set 2 ($\chi^2=14.30$; $p<0.01$), revealing that some odours are better learnt than others. Post-hoc tests showed that (1) hexanol and octanal were better learnt than octanol (Fig. 1a, upper panel) and (2) the hexanol + hexanal mixture was better learnt than the hexanol + octanol mixture (Fig. 1a, lower panel). In the case of single substances of set 2, we did not find significant post-hoc differences between odours

after correction of the alpha-level; yet, nonanal tended to be better learnt than heptanol ($p_{\text{corr}}=0.061$).

References

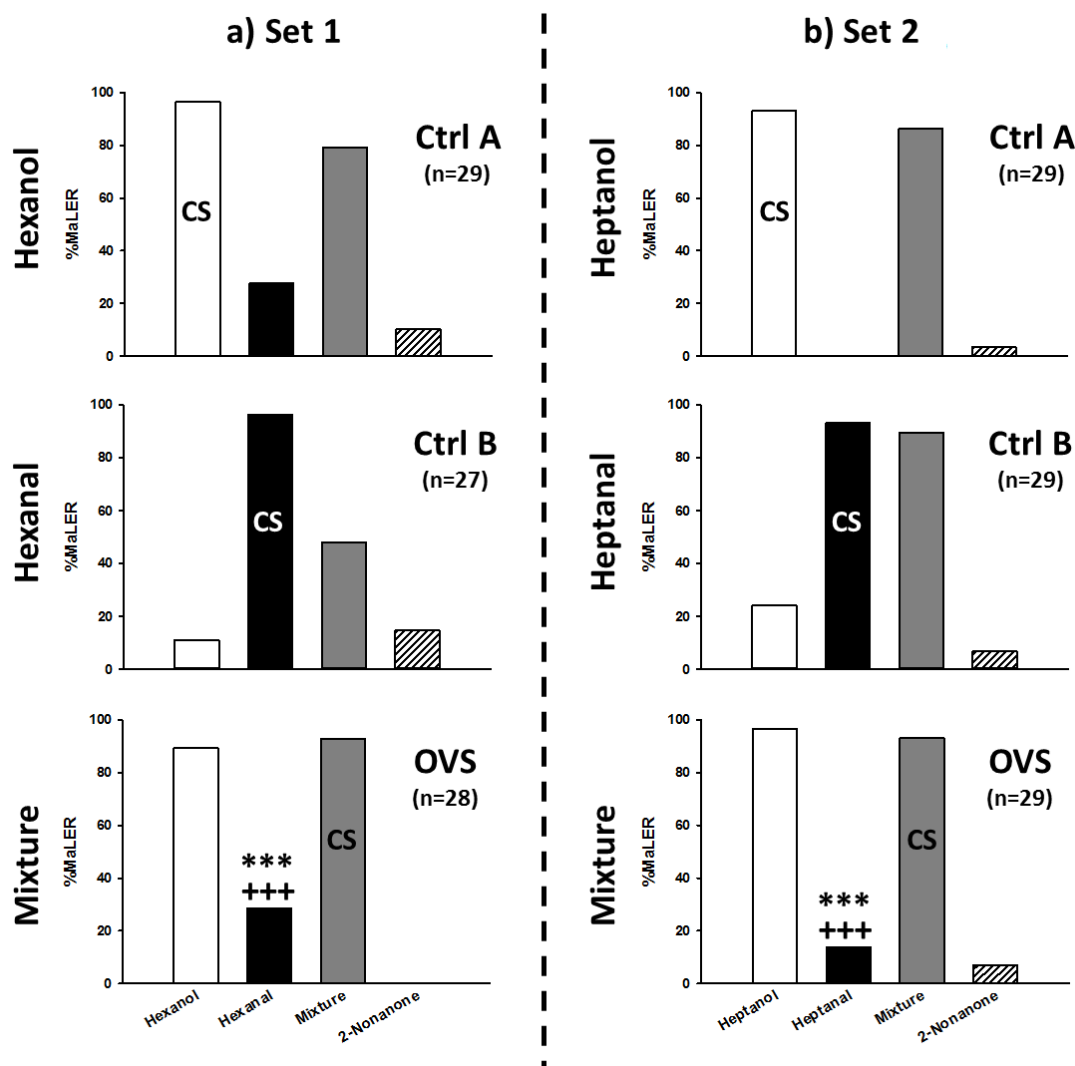
1. Bates, D., Maechler, M. & Bolker, B. *lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and Eigenpack*. (2011). at <<http://lme4.r-forge.r-project.org/>>
2. Guerrieri, F. J. & d’Ettorre, P. Associative learning in ants: conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *J. Insect Physiol.* **56**, 88–92 (2010).

	Combination of odours	Novel odour
Set 1	hexanol/hexanal	2-nonanone
	hexanol/octanol	2-nonanone
	hexanol/octanal	2-hexanone
	hexanal/octanol	2-heptanone
	hexanal/octanal	2-nonanone
	octanol/octanal	2-nonanone
Set 2	heptanol/heptanal	2-nonanone
	heptanol/nonanol	2-octanone
	heptanol/nonanal	2-octanone
	heptanal/nonanol	2-octanone
	heptanal/nonanal	2-octanone
	nonanol/nonanal	2-octanone

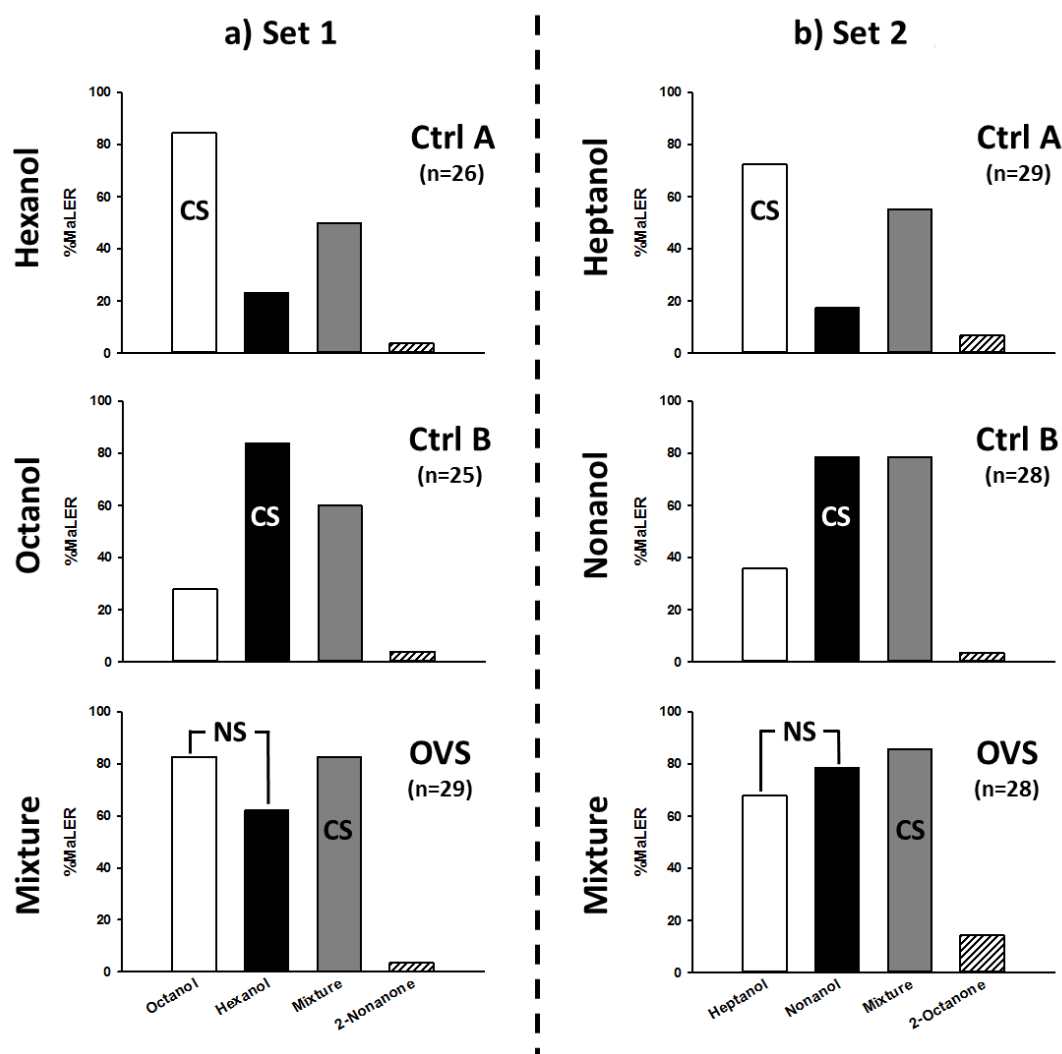
Supplementary Table 1: Odour combinations of alcohols and aldehydes presented in sets 1 and 2 with the ketone used as a novel odour in the tests. The ketone tested was unknown to the ants and allowed to measure the tendency to generalise olfactory responses.

	Odours	Purity (%)	VP [mmHg] 25°C	Dilution (in 1 ml)	
				$\mu\text{l odour}$ ($1/\text{VP} \times 10$)	$\mu\text{l mineral oil}$
Set 1	hexanol	99	0,93	10,8	989,2
	hexanal	97	11,3	0,9	999,1
	octanol	99,5	0,08	125	875
	octanal	99	1,18	8,5	991,5
Set 2	heptanol	99	0,22	45,5	954,5
	heptanal	95	3,52	2,8	997,2
	nonanol	98	0,02	500	500
	nonanal	95	0,37	27	973
Novel	2-hexanone	98	11,6	0,9	999,1
	2-heptanone	98	3,85	2,6	997,4
	2-octanone	98	1,35	7,4	992,6
	2-nonanone	99	0,65	15,4	984,6

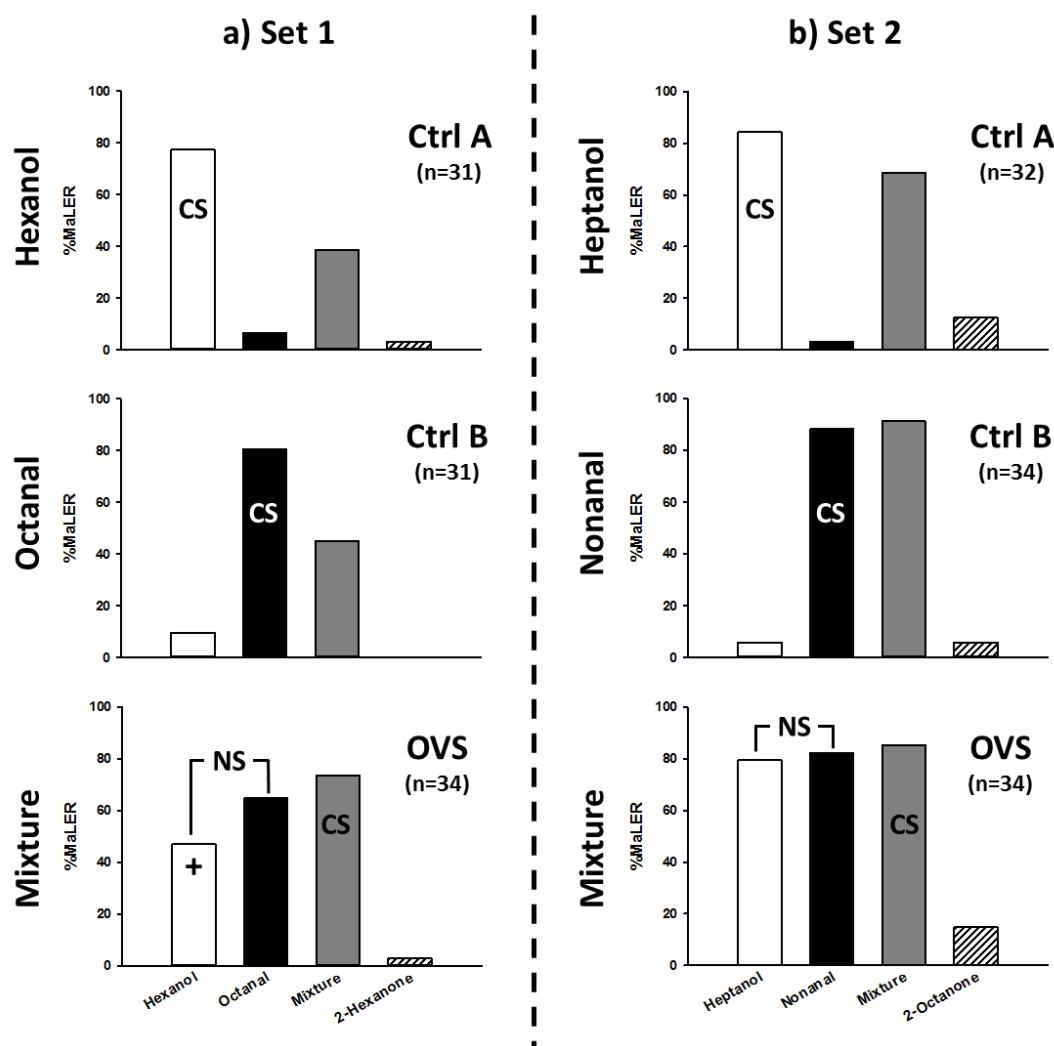
Supplementary Table 2: Chemical characteristics of the odours used in sets 1 and 2, and of the novel test odours. Purity (commercial description of the product), vapour pressure (VP) and dilution quantities in mineral oil are indicated for each odour.



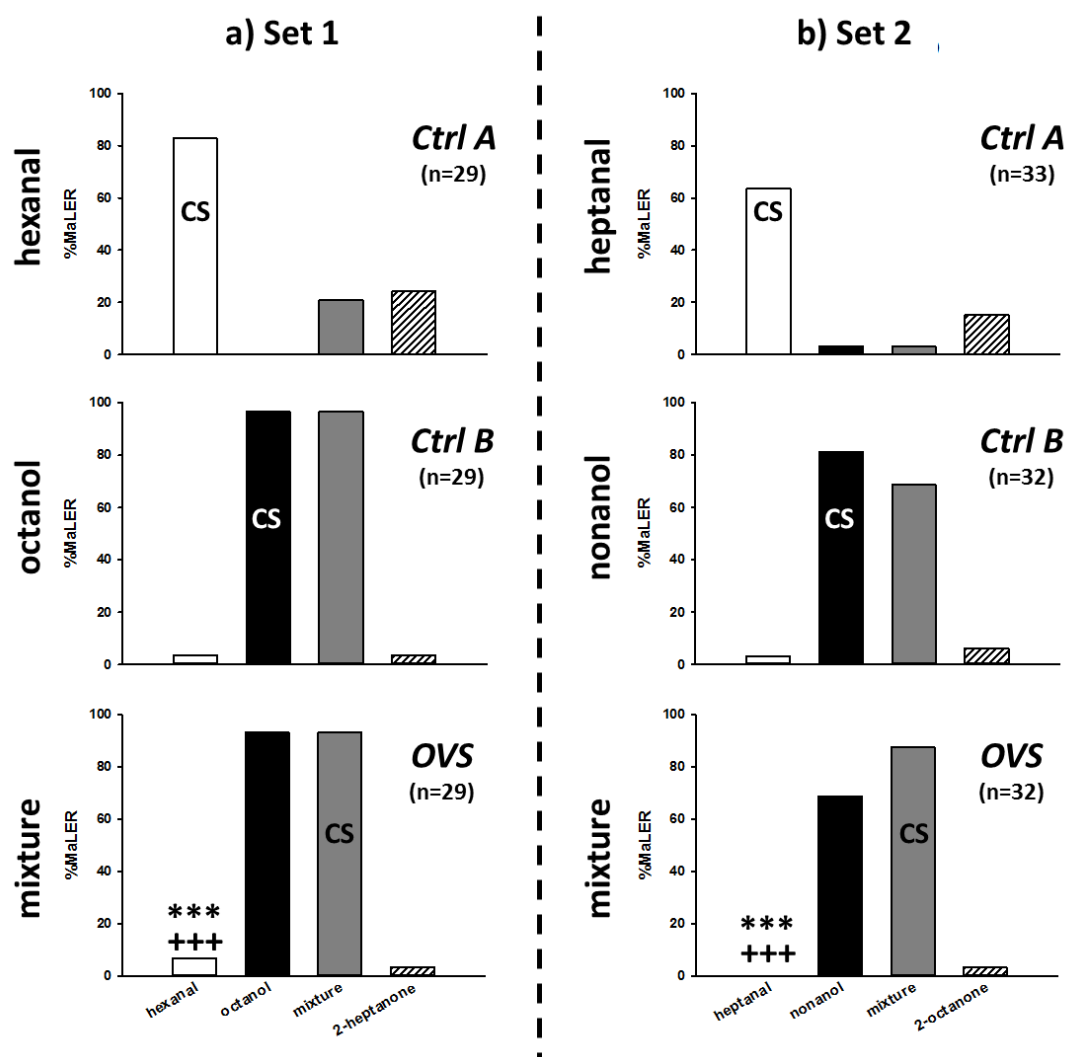
Supplementary Figure 1: Test responses to combinations of an alcohol and an aldehyde with the same and the shortest carbon-chain length of each odour set (set 1: hexanol/hexanal; set 2: heptanol/heptanal). a) Responses of the control groups (*Ctrl A*: hexanol; *Ctrl B*: hexanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: hexanol + hexanal). White bars represent responses to hexanol, black bars responses to hexanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-nonanone). **b)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: heptanol; *Ctrl B*: heptanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: heptanol + heptanal). White bars represent responses to heptanol, black bars responses to heptanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-nonanone). Sample size (n) of each group for both odour sets is indicated in parentheses. Overshadowing occurred in both mixtures as shown by the lower responses to one odour after mixture training (white vs. black bar in *OVS* groups: ***; $p < 0.001$) and by the reduction of responses to that odour after mixture training compared to responses after training to the odour alone (comparison of black bars of *Ctrl B* and *OVS* groups: +++; $p < 0.001$).



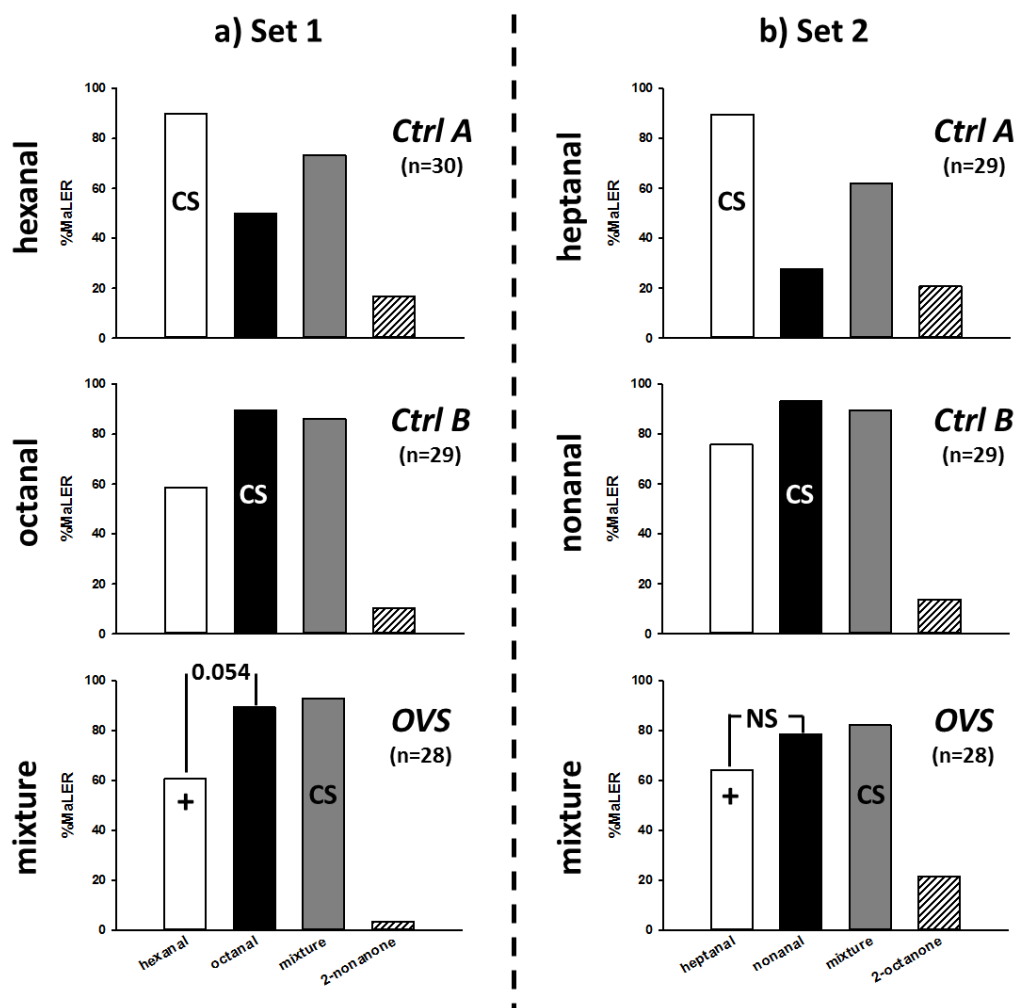
Supplementary Figure 2: Test responses to combinations of two alcohols with carbon-chain lengths differing in two carbons in odour sets 1 (hexanol/octanol) and set 2 (heptanol/nonanol). **a)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: hexanol; *Ctrl B*: octanol) and the group trained to the mixture (*OVS*: hexanol + octanol). White bars represent responses to hexanol, black bars responses to octanol, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-nonanolone). **b)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: heptanol; *Ctrl B*: nonanol) and the group trained to the mixture (*OVS*: heptanol + nonanol). White bars represent responses to heptanol, black bars responses to nonanol, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-octanone). Sample size (n) of each group for both odour sets is indicated in parentheses. No overshadowing occurred in both mixtures as shown by similar high levels of responses to both components after mixture training (white vs. black bar in *OVS* groups: NS, non-significant).



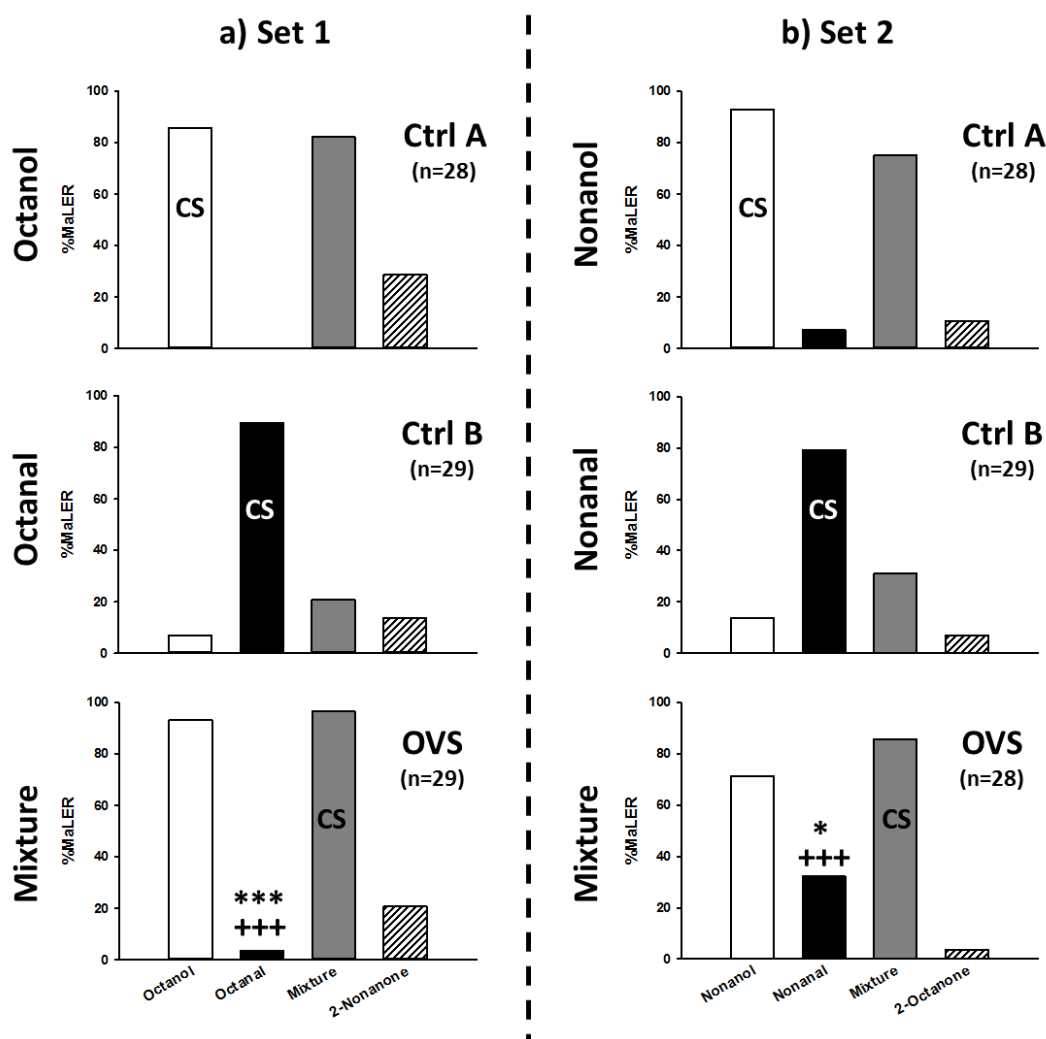
Supplementary Figure 3: Test responses to combinations of an alcohol with the shortest carbon-chain length and an aldehyde with the longest carbon-chain length of each odour set (set1: hexanol/octanal; set2: heptanol/nonanal). a) Responses of the control groups (*Ctrl A*: hexanol; *Ctrl B*: octanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: hexanol + octanal). White bars represent responses to hexanol, black bars responses to octanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-hexanone). **b)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: heptanol; *Ctrl B*: nonanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: heptanol + nonanal). White bars represent responses to heptanol, black bars responses to nonanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-octanone). Sample size (n) of each group for both odour sets is indicated in parentheses. No overshadowing occurred in both mixtures as shown by similar high levels of responses to both components after mixture training (white vs. black bar in *OVS* groups: NS, non-significant), although responses to hexanol were significantly lower after mixture training than responses after training to hexanol alone (+; $p < 0.05$).



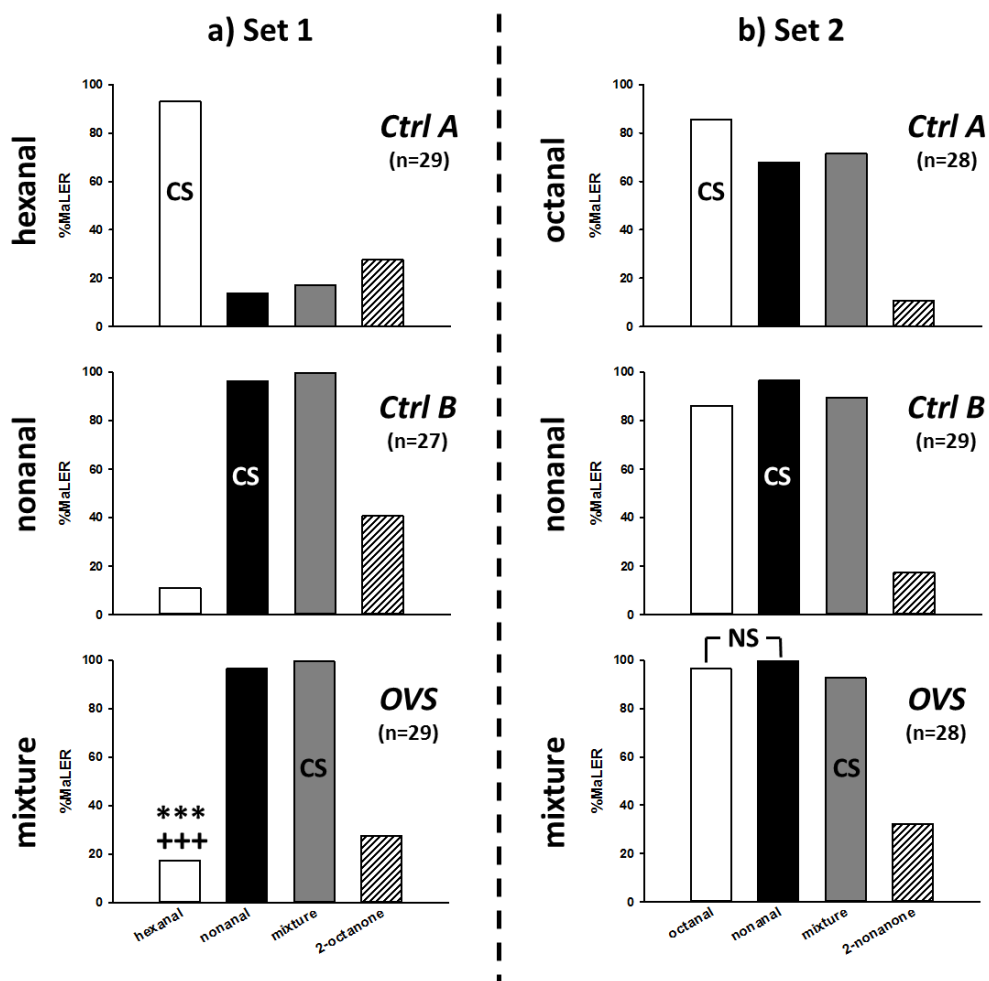
Supplementary Figure 4: Test responses to combinations of an alcohol with the longest carbon-chain length and an aldehyde with the shortest carbon-chain length of each odour set (set 1: hexanal/octanol; set 2: heptanal/nonanol). a) Responses of the control groups (*Ctrl A*: hexanal; *Ctrl B*: octanol) and the group trained to the mixture (*OVS*: hexanal + octanol). White bars represent responses to hexanal, black bars responses to octanol, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-heptanone). **b)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: heptanal; *Ctrl B*: nonanol) and the group trained to the mixture (*OVS*: heptanal + nonanol). White bars represent responses to heptanal, black bars responses to nonanol, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-octanone). Sample size (n) of each group for both odour sets is indicated in parentheses. Overshadowing occurred in both mixtures as shown by the lower responses to one odour after mixture training (white vs. black bar in *OVS* groups: ***; $p < 0.001$) and by the reduction of responses to that odour after mixture training compared to responses after training to the odour alone (comparison of white bars of *Ctrl A* and *OVS* groups: +++; $p < 0.001$).



Supplementary Figure 5: Test responses to combinations of two aldehydes with carbon-chain lengths differing in two carbons in odour sets 1 (hexanal/octanal) and set 2 (heptanal/nonanal). **a)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: hexanal; *Ctrl B*: octanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: hexanal + octanal). White bars represent responses to hexanal, black bars responses to octanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-nonanone). **b)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: heptanal; *Ctrl B*: nonanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: heptanal + nonanal). White bars represent responses to heptanal, black bars responses to nonanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-octanone). Sample size (n) of each group for both odour sets is indicated in parentheses. Overshadowing occurred in the hexanal + octanal mixture as shown by the lower responses to hexanal after mixture training (white vs. black bar in the *OVS* group: $p=0.054$) and by the reduction of responses to hexanal after mixture training compared to responses after training to hexanal alone (comparison of white bars between *Ctrl A* and *OVS*: +; $p < 0.05$). The high level of generalization from nonanal to heptanal (white vs. black bars within *Ctrl B*) determined that responses to these odours were similarly high after mixture training (white and black bars of the *OVS* group). Thus, no overshadowing effect could be detected in this case.



Supplementary Figure 6: Test responses to combinations of an alcohol and an aldehyde with the same and the longest carbon-chain length of each odour set (set 1: octanol/octanal; set2: nonanol/nonanal). a) Responses of the control groups (*Ctrl A*: octanol; *Ctrl B*: octanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: octanol + octanal). White bars represent responses to octanol, black bars responses to octanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-nonanone). **b)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: nonanol; *Ctrl B*: nonanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: nonanol + nonanal). White bars represent responses to nonanol, black bars responses to nonanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-octanone). Sample size (n) of each group for both odour sets is indicated in parentheses. Overshadowing occurred in both mixtures as shown by the lower responses to one odour after mixture training (white vs. black bar in *OVS* groups: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$) and by the reduction of responses to that odour after mixture training compared to responses after training to the odour alone (comparison of black bars of *Ctrl B* and *OVS* groups: +++, $p < 0.001$).



Supplementary Figure 7: Test responses to combinations of two aldehydes with carbon-chain lengths differing in three [a) hexanal/nonanal] or one carbon [b) octanal/nonanal]. **a)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: hexanal; *Ctrl B*: nonanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: hexanal + nonanal). White bars represent responses to hexanal, black bars responses to nonanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-octanone). **b)** Responses of the control groups (*Ctrl A*: octanal; *Ctrl B*: nonanal) and the group trained to the mixture (*OVS*: octanal + nonanal). White bars represent responses to octanal, black bars responses to nonanal, grey bars responses to the mixture and hatched bars responses to the novel odour tested for generalization (2-nonanone). Sample size (n) of each group for both odour sets is indicated in parentheses. Overshadowing occurred in the hexanal + nonanal mixture as shown by the lower responses to hexanal after mixture training (black vs. white bars in the *OVS* group: ***; $p < 0.001$) and by the reduction of responses to hexanal after mixture training compared to responses after training to the hexanal alone (comparison of white bars between *Ctrl A* and *OVS* groups: +++; $p < 0.001$). The high level of generalization between octanal and nonanal (white and black bars within *Ctrl A* and *Ctrl B*) determined that responses to these odours were similarly high after mixture training (white and black bars of the *OVS* group). Thus, no overshadowing effect could be detected in this case.



Figure S8: Harnessed *Camponotus aethiops* worker. The ant is harnessed in an individual holder (Eppendorf® of 0.2 ml with the tip removed); a strip of adhesive tape is placed between the head and the thorax so that the ant can only move its antennae and mouthparts.

Discussion générale

Discussion générale

Les travaux menés dans cette thèse ont permis d'élargir nos connaissances sur la façon dont la division du travail pourrait émerger chez la fourmi *Camponotus aethiops*. Les résultats obtenus ont également apporté des informations essentielles pour comprendre les facteurs impliqués dans les performances d'apprentissage olfactif appétitif et la perception des odeurs aussi bien simples que complexes chez cette même espèce.

I) La division du travail

1) Illustration du modèle des seuils de réponse chez la fourmi *Camponotus aethiops*

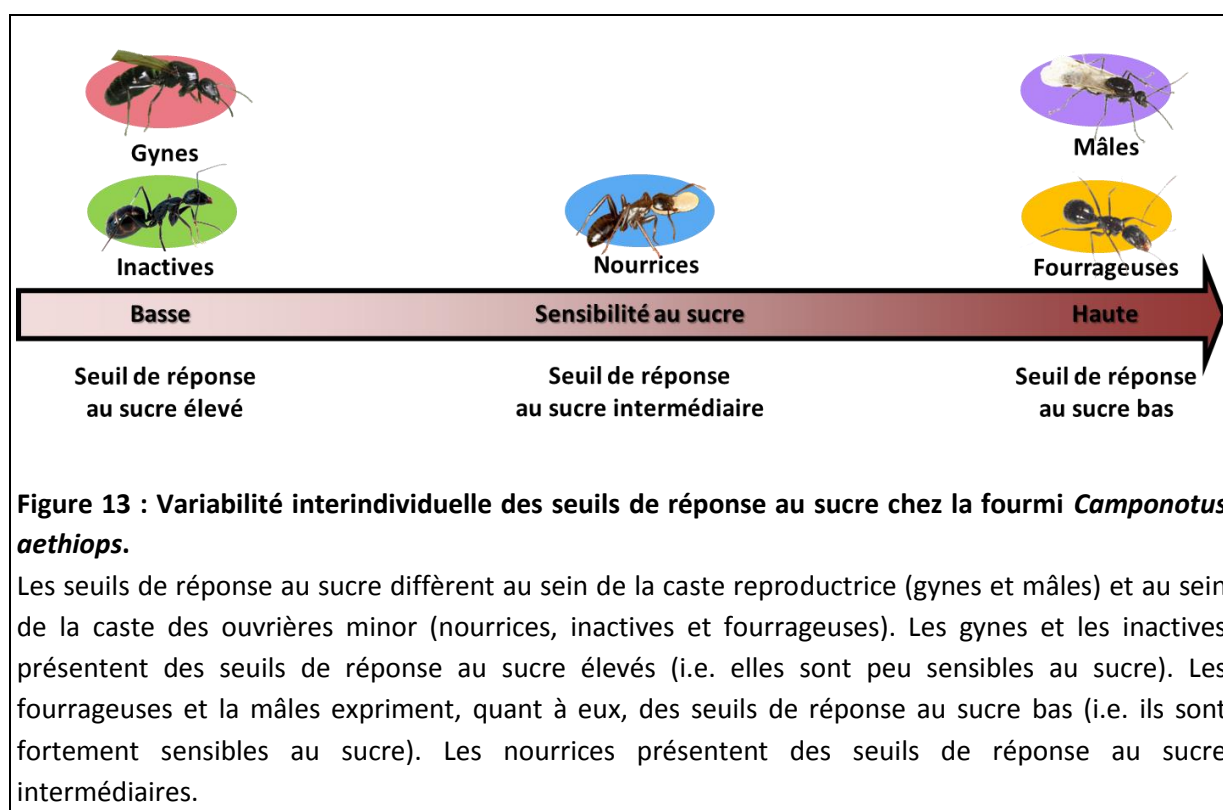
La division du travail est la caractéristique principale des insectes sociaux. Parmi les modèles proposés pour expliquer l'émergence de la division du travail, le modèle des seuils de réponse (Robinson, 1992; Bonabeau et al., 1998; Theraulaz et al., 1998; Beshers & Fewell, 2001 ; voir Introduction, section II.1) est le plus communément accepté. Différentes études chez la fourmi avaient montré qu'il existait des différences dans les seuils de réponse au recrutement entre des ouvrières de tailles différentes (Salzemann & Jaffe, 1991 ; Detrain & Pasteels, 1991, 1992 ; Whitehouse & Jaffe, 1996 ; Hughes & Goulson 2001 ; Kleineidam et al 2007).. Cependant, aucune étude chez la fourmi n'avait mis en évidence que les individus d'une même sous-caste physique présentaient une variabilité interindividuelle dans des seuils de réponse et que cette dernière était corrélée à la spécialisation comportementale des individus. Chez l'abeille, de nombreux travaux ont révélé que les seuils de réponse au sucre (évalués à l'aide du REP, Takeda, 1961) étaient différents entre les fourrageuses spécialisées dans la récolte d'eau, de pollen ou de nectar (Page et al., 1998; Pankiw & Page, 2000; Pankiw et al., 2001; Page et al., 2006). De la même manière, nous avons voulu savoir s'il existait une variabilité interindividuelle dans les seuils réponse au sucre chez la fourmi *Camponotus aethiops* (seuils évalués par la REMaL, Guerrieri & d'Ettorre, 2010) et si

différentes castes exprimaient des réponses au sucre différentes, permettant ainsi d'illustrer le modèle des seuils de réponse chez cet insecte.

Les expériences conduites dans le **Chapitre I** de cette thèse ont ainsi révélé qu'il existait une variabilité interindividuelle dans les seuils de réponse au sucre chez la fourmi *Camponotus aethiops* et qu'elle était corrélée aux différentes tâches effectuées au sein de la colonie. En effet, nous avons montré que les ouvrières *minors* de différentes castes comportementales (nourrices, ouvrières inactives et fourrageuses) et les individus reproducteurs (gynes non-fécondées et mâles) n'exprimaient pas les mêmes seuils de réponse au sucre (**Figure 13**), permettant ainsi d'exemplifier le modèle des seuils de réponse.

Plus spécifiquement, nos résultats ont mis en évidence que les fourrageuses, dont le rôle est de collecter la nourriture et l'eau, répondaient à des solutions sucrées de faibles concentrations et à l'eau, ce qui s'accorde avec leurs tâches de fourrageuses. Les inactives, dont le rôle est de stocker le nectar dans leur abdomen dans la perspective de le redistribuer, selon les besoins, aux autres congénères de la colonie, répondaient peu aux solutions sucrées. Ce faible niveau de réponse pourrait exprimer une sélectivité plus importante de leur part, les conduisant à ne répondre qu'à des nectars de concentrations élevées. Ainsi, à travers les ouvrières inactives, seuls les nectars les plus riches en calories (donc les plus avantageux en cas d'insuffisance) feraient l'objet d'un stockage. L'état de satiété, induit par le stockage des nectars, pourrait également expliquer le faible niveau de réponse des inactives à la solution sucrée. En effet, il a été préalablement montré que le remplissage du jabot chez l'abeille et la fourmi *Camponotus mus* avait pour conséquence de diminuer la sensibilité au sucre des individus (Page et al., 1998; Pankiw et al., 2001; Falibene & Josens, 2012). Cependant, dans notre étude, les colonies étaient privées de sucre durant trois semaines avant le début des expériences et la physogastrie, généralement observée chez les inactives, n'était plus visible au moment où nous avons réalisé les expériences. De ce fait, il nous paraît peu probable que, dans notre étude, la quasi absence de réponse au sucre des inactives soit attribuable à un état de satiété chez ces dernières, même si on peut supposer que leur jabot puisse encore, après trois semaines, contenir une plus grande quantité de réserves que celui des fourrageuses et des nourrices. Les nourrices quant à elles, ont exprimé des seuils de réponse intermédiaires à ceux des fourrageuses et des inactives,

montrant ainsi une sensibilité à une gamme de concentrations de sucre intermédiaire. Les gynes non-fécondées ont fait état, comme les inactives, d'une faible sensibilité au sucre (i.e. elles étaient sélectives aux solutions sucrées les plus concentrées), ce qui pourrait éventuellement s'expliquer par le fait qu'elles aient besoin de stocker de l'énergie, nécessaire à leur survie durant la fondation claustrale et la ponte des premières ouvrières. Les mâles, comme les fourrageuses, ont exprimé, une forte sensibilité au sucre et à l'eau. Dans la mesure où ils meurent rapidement après l'essaimage, ils n'auraient pas besoin de stocker d'énergie et montreraient une forte sensibilité à ces deux stimuli.



Dans notre étude, la réponse des individus à l'eau était testée avant chaque stimulation sucrée et tous les individus (y compris ceux répondant à l'eau) ont été conservés dans les analyses. Des expériences complémentaires où de l'eau serait offerte à satiété aux fourmis répondant à l'eau avant d'évaluer leurs seuils de réponse permettraient de contrôler un potentiel effet de soif (Pankiw et al., 2004 ; Falibene & Josens, 2012). Cependant, un effet potentiel de la soif ne semble pas expliquer les grandes différences de réponse à l'eau entre les différentes castes. De plus, l'environnement dans lequel étaient placées les fourmis avant

l'évaluation des seuils était un environnement humide, donc il est peu probable que la soif puisse à elle seule expliquer les résultats obtenus.

Les différents profils de réponse que nous avons mis en évidence chez les ouvrières, portaient sur la réponse au sucre des ouvrières *minor*. Dès lors, il serait intéressant d'étudier les profils de réponses des fourmis à d'autres stimuli impliqués dans la réalisation des tâches comportementales (e.g., phéromone du couvain, phéromones d'alarmes) et les profils des autres castes comportementales (e.g., les « gestionnaires de déchets » qui sortent les fourmis mortes et autres déchets du nid) ou sous-castes physiques (e.g., ouvrières *major*), qui montrent des spécialisations comportementales différentes. Par exemple, les ouvrières *major* sont principalement engagées dans la défense de la colonie et ne participent pas au soin au couvain (Hölldobler & Wilson, 1990), l'inverse étant observé pour les ouvrières *minor* nourrices. Ainsi, il est concevable que ces deux castes expriment des sensibilités opposées aux phéromones du couvain et aux phéromones d'alarme.

Chez les insectes sociaux, les tâches comportementales sont généralement réalisées par des individus d'âges différents (polyéthisme temporel, Oster & Wilson, 1978 ; voir Introduction section II.1). Classiquement, les individus les plus jeunes réalisent les tâches à l'intérieur du nid telles que le soin au couvain et les individus les plus âgés, les tâches à l'extérieur du nid telles que le fourragement. Dans la mesure où dans notre étude nous n'avons pas contrôlé l'âge des individus, nous ne pouvons que spéculer sur la relation entre les seuils de réponse au sucre et le polyéthisme temporel. Cependant, il est intéressant de noter que les nourrices, en principe plus jeunes que les fourrageuses et les inactives (Hölldobler & Wilson, 1990), ont des seuils de réponse intermédiaires par rapport à ceux de ces dernières, ce qui laisserait penser que les seuils de réponse des individus changent au cours leur vie. Ainsi, une nourrice se verrait avoir une réponse au sucre augmentée ou diminuée au fur et à mesure qu'elle avancerait en âge et se spécialiserait, de fait, en fourrageuse ou en inactive (**Figure 14**). En effet, dans nos conditions, nous avons pu observer que les nourrices pouvaient devenir fourrageuses ou inactives mais que les inactives ne devenaient jamais nourrices ou fourrageuses et que les fourrageuses ne devenaient jamais nourrices ou inactives. Par conséquent, nous pensons que les nourrices sont plus jeunes et qu'elles se spécialisent soit en inactive soit en fourrageuse en prenant de l'âge. Si les seuils de réponse des fourmis varient au cours du temps et que ces variations

définissent leur rôle, on serait en face d'un modèle beaucoup plus plastique et moins déterministe de la division du travail que celui proposé chez l'abeille. En effet chez cette dernière, il a été montré que les individus exprimaient des seuils de réponse au sucre différents dès leur émergence et que, selon leurs seuils, ils se spécialisaient dans des rôles différents. Ainsi, une abeille ayant un seuil de réponse bas se spécialise en fourrageuse d'eau ou de pollen tandis qu'une abeille ayant un seuil élevé se spécialise en fourrageuse de nectar (Pankiw & Page, 2000; Pankiw et al., 2004). De ce fait, contrairement à l'abeille chez qui il est possible de prédire à un stade précoce (après quelques heures de vie) la spécialisation des fourrageuses à partir de leurs seuils de réponse au sucre, il ne serait pas possible d'établir une telle prédiction chez la fourmi *Camponotus aethiops*.

Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire d'étudier les seuils de réponse au sucre des individus d'une même cohorte tout au long de leur existence et vérifier si d'éventuelles variations corroborent l'orientation du profil comportemental de ces mêmes individus en ouvrières fourrageuses ou inactives.

Dans l'éventualité où les seuils de réponse au sucre varieraient avec l'âge chez la fourmi *Camponotus aethiops*, il serait important de déterminer quels facteurs sont à l'origine de cette variation. Nous allons ainsi proposer dans la section suivante un certain nombre d'hypothèses pour expliquer comment les fourmis pourraient voir leurs seuils modifiés avec l'âge, engendrant ainsi leur spécialisation comportementale en fourrageuses ou en inactives.

2) Hypothèses sur la variation des seuils de réponse avec l'âge

Chez les fourmis et les abeilles, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la spécialisation comportementale des ouvrières et la variabilité interindividuelle dans la réponse à des stimuli associés à des tâches spécifiques. Parmi ces mécanismes, on compte à la fois des **facteurs intrinsèques** [e.g., différences de génotype (Scheiner & Arnold, 2010; Schlüens et al., 2011; Junca et al., 2014) ou des variations dans des niveaux d'amines biogènes (Taylor et al., 1992; Wagener-Hulme et al., 1999; Schulz & Robinson, 1999; Scheiner et al., 2002; Pankiw & Page, 2003; Seid & Traniello, 2005; Seid et al., 2008; Wnuk et al., 2011; Muscedere & Traniello, 2012; Aonuma & Watanabe, 2012; Smith et al., 2013;

Kamhi & Traniello, 2013)] mais également des **facteurs extrinsèques** [e.g., la nourriture (Pankiw et al., 2001) ou l'exposition à des odeurs phéromonales (Pankiw & Page, 2001; Vergoz et al., 2009)].

Parmi les facteurs intrinsèques, l'hypothèse d'une différence génétique à l'origine de différences dans les seuils de réponse est peu probable compte tenu du fait que *Camponotus aethiops* est une espèce monogyne et très probablement monoandre, comme de nombreuses espèces de *Camponotus* (Gadau et al., 1996; Satoh et al., 1997; Gadau et al., 1998; Goodisman & Hahn, 2004).

Concernant les amines biogènes, des études chez l'abeille ont révélé que les niveaux cérébraux de dopamine (DA), de sérotonine (5-HT) et d'octopamine (OA) augmentent de manière drastique avec l'âge et diffèrent entre les castes, les niveaux les plus élevés étant observés chez les fourrageuses (**Tableau 1**). Il a été proposé que l'augmentation du niveau d'OA pourrait être liée à la spécialisation comportementale en fourrageuse plutôt qu'à l'âge puisque les fourrageuses présentaient un niveau d'OA plus élevé que ceux des nourrices de même âge (**Tableau 1**). Chez la fourmi, les études sur les variations des niveaux d'amines en

Espèce	Objet d'étude	OA	DA	5-HT	Références
<i>A. mellifera</i>	âge	+	+	+	Taylor et al., 1992 ; Wagener-Hulme et al., 1999 ; Schulz & Robinson, 1999 ; Schulz et al., 2004
	caste F et N (âge contrôlé)	+	~	~	Wagener-Hulme et al., 1999 ; Schulz & Robinson, 1999
<i>P. dentata</i>	âge	~	+	+	Seid & Traniello, 2005 ; Seid et al., 2008 ; Muscedere et al., 2012
<i>F. polyctena</i>	caste F et N (âge non-contrôlé)	-	+	~	Wnuk et al., 2011
<i>F. japonica</i>	caste F et C (âge non contrôlé)	+	~	~	Anuma & Watanabe, 2012
<i>S. peetersi</i>	hiérarchie (possible effet de l'âge)	-	+	~	Cuvillier-Hot & Lenoir, 2006
<i>A. echinator</i>	caste F et G (âge contrôlé)	+	+	~	Smith et al., 2013

Tableau 1: Variation des niveaux d'OA, de DA et de 5-HT en fonction de l'âge ou de la caste comportementale.

Variations observées chez l'abeille (*Apis mellifera*) et chez différentes espèces de fourmis (*Pheidole dentata*; *Formica polyctena* ; *Formica japonica* ; *Streblognathus peetersi* ; *Acromyrmex echinator*). Castes comportementales étudiées : fourrageuse (F) ; nourrice (N) ; gestionnaire de déchets (G) ; constructrice du nid (C). « + » : augmentation du niveau des différentes amines biogènes avec l'âge ou niveau supérieur chez les fourrageuses ; « - » : diminution du niveau des différentes amines biogènes avec l'âge ou niveau inférieur chez les fourrageuses ; « ~ » : pas de modification du niveau des différents amines en fonction de l'âge ou de la caste comportementale.

fonction de l'âge ou de la caste sont encore récentes. Elles montrent que les profils sont variables selon les espèces, bien qu'on puisse relever un niveau de DA plus élevé chez les fourrageuses et les individus les plus âgés chez la plupart des espèces étudiées (**Tableau 1**). Une étude récente chez *Acromyrmex echinator* a montré que les niveaux de DA et d'OA étaient spécifiquement associés au rôle du fourragement dans la mesure où les niveaux de ces amines étaient plus élevés chez les fourrageuses que les « gestionnaires de déchets » du même âge (**Tableau 1**). Ainsi, les amines biogènes apparaissent comme des candidates de premier plan pour expliquer les mécanismes proximaux sous-tendant la spécialisation comportementale.

Les études sur les effets de l'OA, de la DA et de la 5-HT chez différentes espèces de fourmis ou d'autres espèces invertébrées suggèrent que ces amines seraient impliquées dans divers aspects comportementaux et/ou dans la sensibilité à certains stimuli (**Tableau 2**). Ainsi, il semblerait que l'OA soit impliquée dans la sensibilité au sucre et aux odeurs ; la DA dans la sensibilité au sucre, dans l'agressivité, le comportement défensif et l'état d'excitation ; la 5-HT dans la sensibilité aux odeurs, le développement du système visuel, l'agressivité et le comportement d'alimentation (sans effet sur la sensibilité au sucre).

Amine biogène	Effet	Espèces	Références
OA	+ sensibilité au sucre	<i>Apis mellifera</i>	Scheiner et al., 2002 Pankiw et al., 2003
	+ sensibilité aux odeurs	<i>Phormia regina</i> <i>Apis mellifera</i> <i>Periplaneta americana</i>	Long & Murdock, 1983 Mercer & Menzel, 1982 Zhukovskaya, 2012
DA	+ agressivité / comportement défensif	<i>Harpegnathos saltator</i> <i>Formica polyctena</i> <i>Pheidole dentata</i>	Hoyer et al., 2005 Szcuka et al., 2013 Kahmi & Traniello, 2013
	+ sensibilité au sucre	<i>Drosophila melanogaster</i>	Inagaki et al., 2012
	- sensibilité au sucre	<i>Apis mellifera</i>	Scheiner et al., 2002
	+ excitation/locomotion	<i>Drosophila melanogaster</i>	Kume et al., 2005
5-HT	+ sensibilité aux odeurs	<i>Pheidole dentata</i> <i>Acromyrmex octospinosus</i>	Muscedere et al., 2012 Kahmi & Traniello, 2013
	+ système visuel / rythme circadien	<i>Pheidole dentata</i>	Seid & Traniello, 2005; Seid et al., 2008
	+ agressivité	<i>Formica rufa</i> <i>Harpegnathos saltator</i> <i>Formica polyctena</i> <i>Pheidole dentata</i> <i>Drosophila melanogaster</i>	Kostowski, 1975 Hoyer et al., 2005 Alekseyenko et al., 2010 Szcuka et al., 2013 Kahmi & Traniello., 2013

Tableau 2 : Liste non-exhaustive de la contribution de l'OA, de la DA et de la 5-HT dans certains comportements et sur la sensibilité à certains stimuli chez les insectes

Abeille (*Apis mellifera*) ; mouche (*Phormia regina* ; *Drosophila melanogaster*) ; blatte (*Periplaneta americana*) ; fourmi (*Harpegnathos saltator* ; *Formica polyctena* ; *Pheidole dentata* ; *Acromyrmex octospinosus* ; *Formica rufa* ; *Formica polyctena*). « + » : augmentation/effet positif ; « - » : diminution/effet négatif.

Si l'on considère l'ensemble des expériences menées chez différentes espèces de fourmi ou l'abeille sur les niveaux d'amines biogènes en fonction de l'âge et de la caste (**Tableau 1**) et le rôle de ces amines dans les différents comportements et dans la sensibilité aux stimuli pertinents dans la réalisation des tâches comportementales (**Tableau 2**), il est légitime de penser que les ouvrières *Camponotus aethiops* expriment des niveaux d'amines différents en fonction de leur âge mais aussi en fonction de leur spécialisation comportementale. En se référant aux études citées précédemment, on peut suggérer que les fourrageuses présentent les niveaux de DA, de 5-HT et d'OA les plus élevés [elles sont fortement sensibles au sucre, en principe plus âgées, réalisent les tâches à l'extérieur du nid, ont une grande activité locomotrice et un plus grand niveau d'agressivité que les nourrices

et les inactives]. Les inactives présenteraient en revanche les niveaux de DA, de 5-HT et d'OA les plus faibles [elles sont peu sensibles au sucre, ne sont pas engagées dans des tâches impliquant essentiellement l'olfaction comme le soin au couvain ou la collecte de nourriture et présentent une activité locomotrice et une agressivité très réduites, plus faibles encore que celles des nourrices (observations personnelles)]. Les nourrices, quant à elles, auraient des niveaux d'amines intermédiaires qui augmenteraient ou diminueraient avec l'âge.

Les modifications des niveaux d'OA, de DA et de 5-HT que nous suggérons au sein des différentes castes comportementales chez *Camponotus aethiops* restent, à ce jour, au rang d'hypothèse. Il serait donc souhaitable d'effectuer dans le futur des dosages (e.g., par chromatographie en phase liquide à haute performance) des différentes amines dans le cerveau des individus, en fonction de leur âge mais aussi de leur caste comportementale lorsque le facteur âge est contrôlé. De plus, pour apporter la démonstration que ces amines biogènes sont responsables de la variation de la réponse au sucre chez la fourmi *Camponotus aethiops*, il serait nécessaire de procéder à des mesures des seuils de réponse avant et après ingestion, ou injection systémique, de ces amines ou d'agonistes et surtout d'antagonistes de leurs récepteurs respectifs. Au vu de l'absence d'effet de la 5-HT sur les seuils de réponse au sucre chez *Camponotus mus* (Falibene et al., 2012), on peut s'attendre à ce que cette amine ne soit pas impliquée dans la sensibilité au sucre chez *Camponotus aethiops*.

Les raisons pour lesquelles les niveaux d'amines biogènes varieraient en fonction de l'âge et de la spécialisation des individus seraient à rechercher parmi un ensemble de facteurs extrinsèques qui affecteraient les niveaux d'expression des gènes codant pour la synthèse de ces amines et/ou leurs récepteurs. Cette hypothèse trouve un certain nombre d'arguments à travers des études ayant montré, chez l'abeille, que l'expression de certains gènes codant pour les récepteurs des amines biogènes était très dynamique chez les jeunes abeilles (McQuillan et al., 2012) et qu'elle pouvait être affectée par l'exposition à une phéromone royale (Grozingier et al., 2003; Vergoz et al., 2009). Une étude plus récente a également montré que la nature de la nourriture pouvait également affecter le niveau d'expression de certains gènes (Wang et al., 2014).

Discussion

En résumé, nous proposons que si sensibilisation ou désensibilisation des seuils de réponse des nourrices avec l'âge il y a, elle résulterait de l'interaction de facteurs extrinsèques (e.g., la qualité de la nourriture, exposition plus ou moins prolongées à certaines phéromones,...) et de facteurs intrinsèques (modification de l'expression des gènes codant pour la synthèse des amines biogènes et/ou leurs récepteurs) (**Figure 14**).

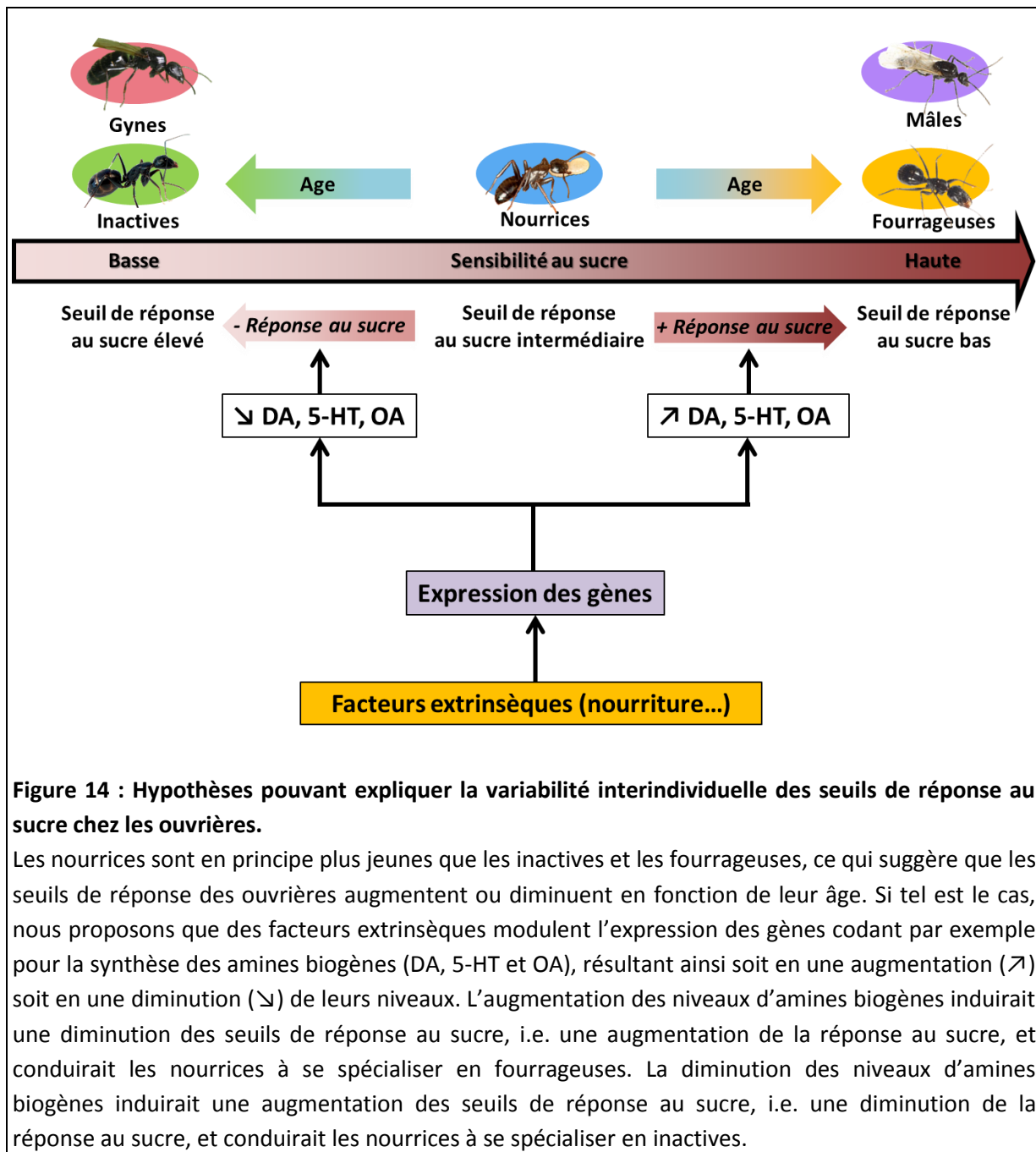


Figure 14 : Hypothèses pouvant expliquer la variabilité interindividuelle des seuils de réponse au sucre chez les ouvrières.

Les nourrices sont en principe plus jeunes que les inactives et les fourrageuses, ce qui suggère que les seuils de réponse des ouvrières augmentent ou diminuent en fonction de leur âge. Si tel est le cas, nous proposons que des facteurs extrinsèques modulent l'expression des gènes codant par exemple pour la synthèse des amines biogènes (DA, 5-HT et OA), résultant ainsi soit en une augmentation (↗) soit en une diminution (↘) de leurs niveaux. L'augmentation des niveaux d'amines biogènes induirait une diminution des seuils de réponse au sucre, i.e. une augmentation de la réponse au sucre, et conduirait les nourrices à se spécialiser en fourrageuses. La diminution des niveaux d'amines biogènes induirait une augmentation des seuils de réponse au sucre, i.e. une diminution de la réponse au sucre, et conduirait les nourrices à se spécialiser en inactives.

II) L'apprentissage associatif olfactif appétitif

Un des principaux objectifs des travaux menés lors de cette thèse était de comprendre quels facteurs pouvaient jouer un rôle critique dans la détermination des performances d'apprentissage olfactif appétitif chez la fourmi *Camponotus aethiops*. Nos résultats montrent que la sensibilité au stimulus inconditionnel et la caste comportementale s'avèrent des variables déterminantes, et que la procédure et les paramètres du conditionnement semblent également influencer les performances d'apprentissage olfactif appétitif des individus.

1) La sensibilité au stimulus inconditionnel

Des études antérieures chez l'abeille ont montré qu'il existe une corrélation entre les seuils de réponse au sucre et les performances d'apprentissage lors de conditionnements tactiles et olfactifs du REP (Scheiner et al., 1999, 2001a, 2001b). Ainsi, les individus les plus sensibles au sucre étaient ceux dont les performances d'apprentissage étaient les meilleures parce qu'ils attribuaient une plus grande valeur à la solution sucrée, utilisée comme récompense. D'autres travaux chez l'abeille, ont montré que les performances d'apprentissage olfactif aversif des individus (où le renforcement est un choc électrique ou une stimulation thermique, provoquant le réflexe d'extension du dard) étaient corrélées à leurs seuils de réponse à ces stimuli aversifs. En effet, plus les abeilles étaient sensibles au choc électrique ou à la stimulation thermique, meilleures étaient leurs capacités d'apprentissage olfactif aversif, respectivement odeur-choc ou odeur-stimulation thermique (Roussel et al., 2009; Junca et al., 2014). De ce fait, ces résultats montrent que les performances d'apprentissage sont, chez les abeilles, sous-tendues par leur sensibilité au stimulus inconditionnel. Nous avons cherché à savoir s'il en était de même chez la fourmi *Camponotus aethiops* (**Chapitre I**). Après avoir évalué les seuils de réponse au sucre à l'aide de la REMaL, nous avons conditionné des fourmis nourrices et fourrageuses à associer une odeur (SC+) avec du sucre tandis qu'une deuxième odeur (SC-) était non-récompensée (conditionnement différentiel). Nous avons montré qu'il existait une corrélation entre la sensibilité au sucre et les performances d'apprentissage olfactif appétitif : plus les fourmis étaient sensibles à la récompense sucrée, mieux elles apprenaient l'association odeur-sucre.

Nous rappellerons ici que la corrélation entre la sensibilité au sucre et les performances d'apprentissage était hautement significative pour les nourrices et s'approchait fortement du seuil de significativité chez les fourrageuses. Nous reviendrons sur ce point dans la section suivante. Quoi qu'il en soit, nos résultats montrent pour la première fois le rôle crucial de la sensibilité au SI dans les performances d'apprentissage chez la fourmi, et s'accordent avec les théories du conditionnement pavlovien stipulant que l'intensité perçue du SI affecte le taux d'apprentissage (Rescorla & Wagner, 1972).

Des travaux chez l'abeille, ont également mis en évidence qu'en ajustant le renforcement appétitif (solution sucrée) à la sensibilité de chaque individu (i.e. en utilisant des solutions sucrées de concentrations différentes de sorte à induire un niveau de réponse similaire chez chaque individu), les individus montraient des performances identiques lors d'un apprentissage tactile appétitif (Scheiner et al., 2005). Ainsi, nous pouvons imaginer que les variations interindividuelles et inter-castes dans les performances d'apprentissage olfactif appétitif chez la fourmi *Camponotus aethiops* pourraient être réduites en ajustant la concentration de la solution sucrée au seuil de réponse de chaque animal.

2) La caste comportementale

La comparaison des niveaux d'acquisition des fourrageuses et des nourrices a révélé de meilleures performances chez les premières (**Chapitre I**). Le fait que les fourrageuses montrent de meilleures performances d'apprentissage que les nourrices est en accord avec leur plus grande sensibilité à la récompense sucrée. De plus, ceci corrobore les résultats de plusieurs travaux antérieurs chez l'abeille ayant mis en évidence que les fourrageuses ou les individus les plus âgés montraient de meilleures performances d'apprentissage olfactif appétitif que les nourrices ou les jeunes abeilles (rappelons ici que du fait du polyéthisme temporel, l'âge et le rôle comportemental sont intimement liés) (Laloi et al., 2001; Scheiner & Amdam, 2009; mais voir Bhagavan et al., 1994; Ben-Shahar & Robinson, 2001, chez l'abeille; et Hannaford et al., 2013, chez le bourdon).

Cependant, comme nous l'avons évoqué dans la section précédente, contrairement aux nourrices, la corrélation entre les performances d'apprentissage et la sensibilité au sucre

chez les fourrageuses, approchait le seuil de significativité. Ce fait pourrait être expliqué par le fait que les fourrageuses peuvent montrer de bonnes performances d'apprentissage y compris lorsqu'elles présentent une faible sensibilité au sucre, ce qui n'est pas le cas des nourrices (**Annexe I**). Ceci suggère donc que la caste comportementale et/ou l'âge joueraient aussi un rôle dans les capacités d'apprentissage chez la fourmi *Camponotus aethiops*. Les plus hautes performances d'apprentissage olfactif appétitif présentées par les fourrageuses seraient pertinentes dans le cadre de leur spécialisation comportementale. En effet, associer les indices environnementaux, notamment olfactifs, avec les sources de nourriture qu'ils prédisent, leur permettrait d'augmenter leur succès de fourragement.

Une hypothèse permettant d'expliquer les meilleures performances d'apprentissage des fourrageuses serait qu'en plus d'être plus sensibles à la récompense sucrée, elles seraient également plus sensibles aux odeurs utilisées dans notre expérience, ce qui leur permettrait de mieux discriminer ces odeurs et/ou apprendre l'association odeur-sucre. A ce sujet, des études chez *Atta mexicana* ont montré que les fourrageuses présentaient une plus grande sensibilité à des essences florales que des « gestionnaires de déchets » (López-Riquelme et al., 2006). L'utilisation de techniques telles que l'électroantennographie permettrait de tester cette hypothèse chez notre espèce. Une plus grande sensibilité aux odeurs chez les fourrageuses s'accorderait avec le fait que les structures impliquées dans le traitement et la perception des odeurs (les LA et les CP) sont plus développées chez cette caste comportementale du fait de leur âge plus avancé ou de leur plus grande expérience olfactive (Gronenberg et al., 1996; Muscedere & Traniello, 2012 ; voir Introduction, section II.1), et/ou que les niveaux d'amines biogènes (e.g., l'OA ou la 5-HT ; **Tableau 2**), seraient, comme nous l'avons suggéré précédemment, plus élevés que chez les nourrices (voir Discussion, section I.2).

Dans nos expériences, nous n'avons étudié les performances d'apprentissage que des ouvrières nourrices et fourrageuses. Il serait donc intéressant d'étudier les performances d'apprentissage d'autres castes. De manière intéressante, au vu de la forte sensibilité au sucre exprimée par les mâles, nos résultats laissent penser qu'ils montreraient de bonnes capacités d'apprentissage olfactif appétitif tandis que les inactives et les gynes, qui sont faiblement sensibles au sucre, devraient présenter de faibles performances d'apprentissage. Comparer les performances d'apprentissage entre ces différentes castes nous permettrait

peut-être de dissocier l'effet de la sensibilité au sucre et celui de la caste. En effet, les mâles présentaient la même sensibilité au sucre que les fourrageuses donc comparer les niveaux d'acquisition entre ces deux castes serait particulièrement pertinent dans la mesure où il serait surprenant que les mâles montrent des capacités d'apprentissage olfactif appétitif similaires à celles des fourrageuses ou même supérieures à celles des nourrices, des gynes et des inactives.

3) La procédure et les paramètres du conditionnement

La procédure (conditionnement absolu vs conditionnement différentiel) et les paramètres du conditionnement [e.g., nombre d'essais ou intervalle inter-essai (IIE)] s'avèrent des variables critiques dans la dynamique des performances d'apprentissage et la rétention à long terme de l'information apprise, chez les vertébrés comme chez les invertébrés (Fanselow & Tighe, 1988; Tully et al., 1994; Kogan et al., 1997; Gerber et al., 1998; Menzel, 1999; Barela, 1999; Menzel et al., 2001; Dyer & Chittka, 2004; Giurfa, 2004; Deisig et al., 2007; Giurfa et al., 2009; Frost et al., 2012).

Bien que nous n'ayons pas spécifiquement étudié la contribution de certaines de ces variables dans les performances d'apprentissage et de mémoire, au vu des résultats obtenus dans ce travail de thèse, nous pouvons émettre un certain nombre d'hypothèses sur leur influence chez la fourmi *Camponotus aethiops*.

Concernant l'effet de la procédure de conditionnement, nous avons révélé dans le **Chapitre II**, que les fourmis entraînées à différencier deux odeurs similaires (conditionnement différentiel) présentaient des niveaux de réponse conditionnée au SC+ inférieurs à ceux des fourmis entraînées à associer uniquement une odeur à la récompense sucrée (conditionnement absolu). Ainsi, il semblerait que la procédure de conditionnement influence les taux d'acquisition au cours des essais. Ces différences entre les performances d'apprentissage pourraient être dues au chevauchement des gradients excitateurs et inhibiteurs, respectivement sous-tendus par le SC+ et le SC-, lors du conditionnement différentiel (voir Introduction, section II.1). En effet, la modélisation de ces gradients nous a permis de montrer que l'effet inhibiteur induit par le SC- s'étendait jusqu'au SC+, pouvant ainsi expliquer les niveaux d'acquisition et de rétention inférieurs lors d'un conditionnement

différentiel. Dans notre expérience, les odeurs utilisées étaient similaires. On peut ainsi imaginer que plus les stimuli utilisés comme SC+ et SC- diffèrent, moins les gradients excitateur et inhibiteur se chevauchent et meilleures sont les performances d'apprentissage. Cette remarque, qu'il reste à tester, va dans le sens de nombreux résultats montrant que plus les stimuli sont similaires, plus il est difficile d'apprendre à les discriminer (e.g., dans la modalité olfactive, Daly et al., 2001; Cleland et al., 2002; Deisig et al., 2002; van Wilgenburg et al., 2012).

Cependant, nous ne pouvons pas affirmer de manière catégorique que seule la procédure de conditionnement soit à l'origine des différences d'acquisition entre les fourmis entraînées avec un conditionnement absolu et celles entraînées avec un conditionnement différentiel dans la mesure où les IIE différaient entre les deux procédures. En effet, dans notre protocole, seul le temps entre deux présentations du SC+ était identique. Ainsi, alors que l'IIE était de 15min pour les fourmis sujettes au conditionnement différentiel, il était de 30min en moyenne pour les fourmis sujettes au conditionnement absolu. L'effet potentiel de l'IIE ne peut être négligé au regard des performances d'acquisition particulièrement élevées lorsque les fourmis étaient entraînées dans le cadre d'un conditionnement absolu où l'IIE était long (en moyenne, 91% des individus conditionnés avec un aldéhyde présentaient la réponse conditionnée dès le 3^{ème} essai du conditionnement avec un IIE de 30min; **Chapitre II**). A titre de comparaison, les fourmis sujettes à la même procédure de conditionnement avec et avec les mêmes aldéhydes mais dont l'IIE était plus court montraient des taux d'acquisition plus faibles (avec un IIE de 15min, le niveau de réponse au 3^{ème} essai de conditionnement était en moyenne de 54%; **Chapitre III**). Des études précédentes chez l'abeille ont d'ailleurs rapporté que généralement lors d'un conditionnement absolu ou différentiel plus l'IIE était important, meilleurs étaient les taux d'acquisition du SC+ (Gerber et al., 1998; Menzel et al., 2001; Deisig et al., 2007). Cependant, des IIE supérieurs à 10min, n'amélioreraient pas les niveaux d'acquisition (Menzel et al., 2001). Ceci suggère que la durée de l'IIE maximisant les performances d'acquisition puissent varier entre les abeilles et les fourmis *Camponotus aethiops*.

En résumé, il semblerait que des facteurs tels que la procédure de conditionnement ou certains de ses paramètres, tel que l'IIE, puissent jouer un rôle dans les performances d'acquisition. Des expériences spécifiquement conçues pour étudier les effets de ces

différents facteurs nous paraissent indispensables pour déterminer à quel degré ils sont respectivement impliqués dans les performances d'acquisition et de rétention de l'information olfactive.

III) La perception des odeurs

Les expériences conduites dans les **Chapitres II et III** de cette thèse avaient pour objet de définir si certaines dimensions chimiques des odeurs pouvaient jouer un rôle dans la similarité perceptuelle et dans la perception des mélanges d'odeurs binaires. Nous avons également souhaité déterminer si les relations de similarité perceptuelle pouvaient être modifiées par l'expérience. Nos résultats montrent que les dimensions chimiques, la procédure et les paramètres du conditionnement jouent un rôle déterminant dans la façon dont les fourmis *Camponotus aethiops* traitent les odeurs simples ou les mélanges d'odeurs.

1) La structure chimique des odeurs : un facteur déterminant dans la perception des odeurs simples et des mélanges d'odeurs binaires

Les molécules odorantes diffèrent dans de nombreuses dimensions (longueur de chaîne carbonée, groupe fonctionnel, présence d'un cycle aromatique, etc ; Johnson & Leon, 2007; Haddad et al., 2008). Il devient donc très rapidement complexe d'étudier comment l'ensemble de ces dimensions influence le traitement et la perception des odeurs. Ainsi, les recherches visant à déterminer les propriétés chimiques influençant la perception des odeurs chez l'animal sont généralement effectuées en sélectionnant des molécules odorantes de sorte à ce que leurs structures chimiques ne varient que dans un nombre limité de dimensions (on parle alors de séries homologues). Par exemple, étudier l'effet de l'augmentation progressive de la longueur de chaîne carbonée de composés aliphatiques linéaires comportant un même groupe fonctionnel, ou l'effet de la variation du groupe fonctionnel entre des composés aliphatiques linéaires présentant la même longueur de chaîne carbonée, permet de comprendre comment des changements élémentaires dans la structure d'une molécule odorante peuvent affecter la perception et le traitement des odeurs (Sachse et al., 1999; Daly et al., 2001; Guerrieri et al., 2005; Johnson & Leon, 2007; van Wilgenburg et al., 2012; Bos et al., 2012, 2013). C'est cette approche que nous avons

adoptée dans cette thèse. Nous avons cherché à déterminer la contribution des dimensions chimiques telles que la longueur de la chaîne carbonée ou le groupe fonctionnel dans la perception des odeurs. Nous voulions savoir s'il était possible d'établir des règles prédictives relatives à la similarité perceptuelle ou à la perception des mélanges d'odeurs binaires sur la base de ces dimensions.

a) La similarité perceptuelle

De nombreux travaux chez les vertébrés et les invertébrés, ont montré que la similarité perceptuelle (i.e. la généralisation) dépendait de la similarité structurelle des odeurs en termes de groupe fonctionnel et de chaîne carbonée (Smith & Menzel, 1989; Laska & Freyer, 1997; Laska & Teubner, 1998, 1999; Laska et al., 1999*a*, 1999*b*; Linster & Hasselmo, 1999; Laska & Hübener, 2001; Daly et al., 2001; Cleland et al., 2002; Guerrieri et al., 2005; Bos et al., 2013; Barth et al., 2014). Ces études ont par exemple montré que la généralisation d'une réponse comportementale à différentes molécules odorantes était plus importante entre des odeurs appartenant au même groupe fonctionnel ou ayant des longueurs de chaîne carbonée similaires. La longueur de la chaîne carbonée s'est d'ailleurs avérée être un axe de variation pertinent dans la similarité perceptuelle des odeurs puisque pour un même groupe fonctionnel, les niveaux de généralisation se sont révélés inversement proportionnels à la différence du nombre de carbones entre les molécules utilisées (Laska & Teubner, 1998, 1999; Laska et al., 1999*a*, 1999*b*; Linster & Hasselmo, 1999; Laska & Hübener, 2001; Daly et al., 2001; Guerrieri et al., 2005).

Nous avons ainsi voulu vérifier si des résultats comparables pouvaient être retrouvés chez la fourmi *Camponotus aethiops*. Les résultats obtenus dans les **Chapitres II** et **III** corroborent effectivement ceux rapportés chez nombre d'espèces. Ainsi, nous avons montré qu'après un conditionnement absolu avec une molécule appartenant au groupe des aldéhydes, les fourmis généralisaient fortement vers des nouvelles molécules du même groupe fonctionnel et que ces niveaux de généralisation étaient inversement proportionnels à la différence du nombre de carbones entre ces molécules et l'odeur conditionnée. Il serait souhaitable que d'autres molécules présentant des groupes fonctionnels différents (alcools,

cétones, esters, etc.) puissent faire l'objet d'une étude comparable afin de vérifier la consistance et la portée de ce phénomène dans la perception des odeurs chez la fourmi.

b) La perception des mélanges d'odeurs binaires

De nombreuses études portant sur la perception des mélanges d'odeurs ont révélé que dans certains cas, des interactions pouvaient se produire au sein d'un mélange (pour revue récente, Thomas-Danguin et al., 2014). Le phénomène d'*overshadowing* (Pavlov, 1927; Kamin, 1968, 1969 ; voir Introduction, section **I.2.b**), qui permet de révéler des interactions au sein d'un mélange d'odeurs, a été rapporté aussi bien chez les vertébrés (Linster & Smith, 1997; Kay et al., 2005) que les invertébrés (Smith, 1996; Derby et al., 1996; Pelz et al., 1997; Smith, 1998). Cependant, les recherches menées jusqu'à ce jour n'avaient pas permis de déterminer les règles déterminant son occurrence.

En adoptant une analyse systématique de l'effet du groupe fonctionnel et de la longueur de la chaîne carbonée dans l'occurrence du phénomène d'*overshadowing* au sein d'un mélange d'odeurs binaire, nous avons pu montrer que celui-ci reposait sur la combinaison de ces dimensions (**Chapitre III**). De ce fait, ce phénomène obéirait à certaines règles spécifiques, basées sur les propriétés chimiques des odeurs. Plus particulièrement, nos résultats montrent que l'*overshadowing* ne se produit pas au sein de mélanges binaires composées de deux alcools, mais qu'il semble survenir au sein d'un mélange composé de deux aldéhydes, bien que les hauts niveaux de généralisation au sein de ce groupe fonctionnel rendent son identification difficile (les aldéhydes à longue chaîne carbonée domineraient les aldéhydes à chaîne plus courte). Enfin, les alcools dominent les aldéhydes ayant une longueur de chaîne carbonée identique ou plus courte. Ces résultats indiquent ainsi une certaine saillance des alcools lorsqu'ils sont mélangés avec des aldéhydes et des chaînes carbonées longues lorsqu'elles sont mélangées avec des chaînes courtes, ce qui est en accord avec de précédents travaux menés chez la même espèce *Camponotus aethiops* (Bos et al., 2013). Notre étude montre ainsi qu'au sein d'un mélange binaire, les fourmis ne perçoivent pas nécessairement tous les composants du mélange mais qu'elles dirigent leur comportement sur la base de composants clefs. Ce sont les propriétés chimiques des odeurs composant le mélange qui déterminent leur rôle de composant « dominant » ou « dominé »,

en fonction également des propriétés des composants avec lesquels ils sont mélangés. Par exemple dans notre étude, l'octanal dominait l'hexanal mais il était dominé par l'octanol. De plus, notre étude suggère que seules les propriétés chimiques des composants déterminent leur rôle au sein du mélange puisque le succès d'apprentissage des composants seuls ne permet pas de prédire la réponse aux composants du mélange. Effectivement, l'octanol était moins bien appris que l'octanal lorsque les fourmis étaient conditionnées à ces odeurs seules, pourtant l'octanol dominait l'octanal lorsqu'ils étaient mélangés. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études chez l'abeille (Pham-Delègue et al., 1993; Laloi et al., 2000; Reinhard et al., 2010) rapportant que les individus conditionnés à un mélange complexe d'odeurs, répondent plus à certains composants qu'à d'autres et que les facteurs conduisant à ce qu'un ou plusieurs composants du mélange soient des composants clefs dépendent fortement de l'identité des autres composants du mélange et non de leur facilité à être appris dans une procédure de conditionnement absolu.

Nous avons par ailleurs voulu déterminer si les odeurs que nous avons employées lors de nos expériences faisaient partie des produits sémio-chimiques naturellement produits et libérés par les ouvrières *Camponotus aethiops*. En effet, si une molécule odorante fait partie d'un mélange naturel libéré par une ouvrière dans le but de recruter ou d'alarmer ses congénères, il serait particulièrement pertinent pour les fourmis de la percevoir lorsqu'elle se trouve mélangée avec d'autres odeurs. En d'autres termes, les règles de dominance que nous avons extraites dans le **Chapitre III**, pourraient aussi être le résultat de la pertinence écologique de certaines molécules odorantes pour les fourmis. L'analyse des composés présents dans les glandes mandibulaires, la glande de Dufour et la glande à poison (glandes libérant les composants impliqués dans le recrutement ou l'alarme chez les fourmis du genre *Camponotus*, Ayre & Blum, 1971; Duffield & Blum, 1975; Traniello, 1977; Hefetz & Orion, 1982; Haak et al., 1996; Kohl et al., 2001, 2003; Fujiwara-Tsujii et al., 2006) n'a révélé la présence d'aucune des molécules odorantes que nous avons employées lors de nos expériences comportementales ni aucune molécule odorante apparentée en termes de groupe fonctionnel (**Annexe II**). Ainsi, les règles de dominance relatives au phénomène d'*overshadowing* que nous avons extraites dans notre étude ne sont pas expliquées par des propriétés fonctionnelles d'un mécanisme adapté à la perception olfactive de composants présents dans les glandes des ouvrières *Camponotus aethiops*.

Dans notre étude sur la perception des mélanges d'odeurs, nous n'avons travaillé qu'avec des mélanges binaires où les pressions de vapeur des composants étaient égalisées. Des travaux antérieurs ont par exemple montré que le ratio ou le nombre de composants du mélange constituaient des variables critiques dans la perception des mélanges d'odeurs (e.g., Laing & Francis, 1989; Livermore & Laing, 1998; Kay et al., 2005; Coureaud et al., 2011; Thomas-Danguin et al., 2014). Ainsi, des études supplémentaires manipulant ces variables seraient souhaitables pour mieux comprendre comment la fourmi *Camponotus aethiops* perçoit les mélanges d'odeurs dans un contexte naturel où la quantité et la qualité des odeurs, émises par exemple par les plantes, peuvent varier dans le temps et dans l'espace (Dudareva et al., 2004).

Les nombreuses molécules odorantes présentes sur la cuticule des fourmis (i.e. les hydrocarbures cuticulaires) sont d'une importance capitale pour la reconnaissance coloniale (d'Ettorre & Lenoir, 2010 ; van Zweden & d'Ettorre, 2010 ; voir Introduction, section II.3.c). Ainsi, il serait intéressant de reprendre les expériences que nous avons menées dans cette thèse avec des hydrocarbures cuticulaires variant par exemple dans la classe (alcane et alcènes), la longueur de chaîne ou encore le nombre et la position de leurs ramifications méthyle (propriétés chimiques s'étant avérées pertinentes dans ce contexte ; Guerrieri et al., 2009; van Wilgenburg et al., 2010), afin d'accroître nos connaissances sur les phénomènes de reconnaissance coloniale, et étendre la pertinence et la dimension éthologique de nos résultats au domaine de la perception des odeurs sociales.

2) Effet de la procédure et des paramètres du conditionnement sur la similarité perceptuelle

a) La procédure de conditionnement

De nombreuses études ont rapporté que les relations de similarité entre des stimuli n'étaient pas absolues et qu'elles pouvaient être modifiées par l'expérience des individus avec ces stimuli. En effet, il a été montré que les capacités de discrimination et l'acuité perceptuelle pouvait être améliorée par des conditionnements différentiels (e.g., vision : Hanson, 1959; Dyer & Chittka, 2004; Giurfa, 2004; Avarguès-Weber & Giurfa, 2014;

olfaction : Daly et al., 2001; Cleland et al., 2002; Linster et al., 2002; Fletcher & Wilson, 2002; Mishra et al., 2010; Chen et al., 2011; Barth et al., 2014). L'amélioration des capacités de discrimination perceptuelle résultant d'un apprentissage différentiel, révélée par un affinement des gradients de généralisation après cette forme de conditionnement, est généralement expliquée en supposant que les gradients de généralisation excitateur et inhibiteur sous-tendus, respectivement, par le SC+ et le SC- interagissent (i.e. s'additionnent) (Spence, 1936; Hanson, 1959; Ghirlanda & Enquist, 2003).

Un des objectifs de cette thèse était ainsi de déterminer si un conditionnement différentiel olfactif pouvait améliorer les capacités de discrimination olfactive chez la fourmi *Camponotus aethiops* (**Chapitre II**). En adoptant une analyse systématique comparant les conséquences d'un conditionnement absolu et d'un conditionnement différentiel sur les niveaux de généralisation entre des aldéhydes différant dans leur longueur de chaîne carbonée, nous avons montré qu'un conditionnement différentiel améliorait les capacités de discrimination olfactive des fourmis le long de cette dimension. Effectivement, contrairement à un conditionnement absolu, un conditionnement différentiel permettait aux individus de discriminer deux aldéhydes dont la chaîne carbonée ne différait que par un seul atome de carbone. Cependant, ces capacités de discrimination fine, exprimées par les fourmis, n'étaient pas étendues à toutes les odeurs testées mais étaient observées pour les odeurs qui présentaient la même relation de chaîne carbonée que le SC- en comparaison à celle du SC+. Par exemple, lorsque la longueur de chaîne carbonée du SC- était plus courte que celle du SC+, les capacités de discrimination étaient améliorées uniquement pour les odeurs qui présentaient une chaîne carbonée plus courte que celle du SC+. Nos résultats montrent donc qu'il existe une certaine asymétrie dans les gradients de généralisation obtenus après un conditionnement différentiel. En modélisant la somme linéaire des gradients de généralisation excitateur et inhibiteur, respectivement sous-tendus par le SC+ et le SC-, nous avons pu rendre compte de l'asymétrie dans les niveaux de généralisation obtenus après conditionnement différentiel et ainsi illustrer pour la première fois que l'affinement des capacités de discrimination perceptuelle résultait de l'interaction des gradients de généralisation excitateurs et inhibiteurs.

Les effets du conditionnement différentiel sur les relations de similarité entre les odeurs ont été mesurés 15 min après un entraînement constitué de 12 essais (6 essais SC+ et

6 essais SC-). Il nous paraît intéressant de tester à l'avenir si le nombre d'essais est un paramètre déterminant dans l'affinement des capacités de discrimination olfactive et si l'amélioration des capacités de discrimination peut être maintenue à plus long terme. En effet, nous pouvons imaginer que le nombre d'essais serait un paramètre critique dans l'amélioration des capacités de discrimination : plus le nombre d'essais serait important, meilleures seraient les capacités de discrimination des odeurs. Un faible nombre d'essais (1 ou 2) ne permettrait pas ou peu d'augmenter les capacités de discrimination des odeurs tandis qu'un nombre d'essais plus important le permettrait, jusqu'à une certaine limite (i.e. au-delà d'un certain nombre d'essais, les performances de discriminations ne seraient plus améliorées).

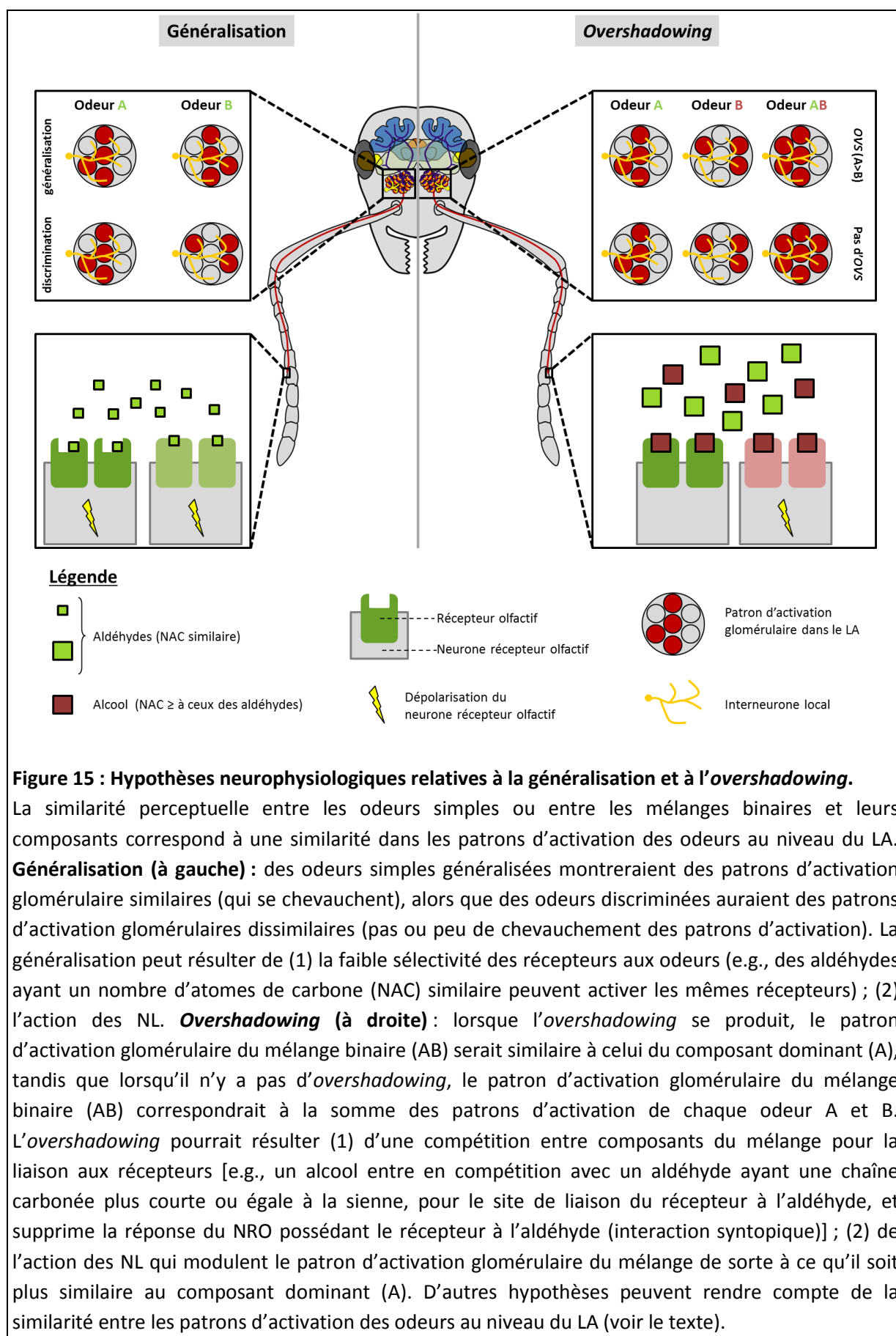
b) Les paramètres du conditionnement : un effet de l'IIE ?

Les études sur les effets des propriétés des molécules odorantes dans la similarité perceptuelle chez la fourmi *Camponotus aethiops*, ont rapporté qu'au sein d'un même groupe fonctionnel ou d'une même classe d'hydrocarbures, la généralisation entre des molécules odorantes pouvaient être asymétrique (Bos et al., 2012, 2013 ; voir Introduction, section II.3.c.i). Dans ces conditions, le niveau de généralisation était généralement plus élevé lorsque la chaîne carbonée de l'odeur testée était plus courte que celle de l'odeur conditionnée. Par exemple, Bos et collaborateurs (2013) ont montré que les fourmis généralisaient plus de l'octanal vers l'hexanal que l'inverse. Dans le **Chapitre III**, nous avons observé une généralisation asymétrique entre le nonanal et l'heptanal, deux odeurs non testées dans le travail de Bos et al (2013), mais nous n'avons pas retrouvé d'asymétrie dans la généralisation entre l'hexanal et l'octanal (i.e. les fourmis généralisaient autant de l'hexanal vers l'octanal que l'inverse). De manière intéressante, les résultats obtenus sur les niveaux de généralisation après un conditionnement absolu (**Chapitre II**) n'ont révélé aucune asymétrie dans les niveaux généralisation entre les odeurs (ni entre hexanal et octanal, ni entre heptanal et nonanal). L'unique paramètre du conditionnement qui diffère systématiquement entre l'étude de Bos et al (2013) et nos études rapportées dans les **Chapitres III** et **II** est l'IIE : respectivement 10, 15 et 30min. Ceci suggère que ce paramètre, qui affecte l'acquisition de l'information olfactive et la consolidation de la mémoire (voir Discussion, section II.3), pourrait également avoir une incidence sur les processus de

généralisation entre des molécules odorantes similaires. En d'autres termes, il semblerait que des IIE de courte durée favoriseraient la généralisation asymétrique. Des expériences spécifiquement conçues pour confirmer l'effet de ce paramètre et définir comment il influence les processus de généralisation olfactive sont donc nécessaires.

3) Hypothèses sur les mécanismes neurophysiologiques supportant les réponses comportementales obtenues

Des études chez les vertébrés et les insectes ont révélé que la similarité perceptuelle des molécules odorantes était corrélée à la similarité de leur représentation neurale dans le premier relai de l'information olfactive (le BO des vertébrés et le LA des insectes ; Linster & Hasselmo, 1999; Daly et al., 2004b; Guerrieri et al., 2005; Youngentob et al., 2006; Kreher et al., 2008; Niewalda et al., 2011; Barth et al., 2014). Ainsi, nous suggérons que la généralisation ou la discrimination observée au niveau comportemental entre les odeurs simples (**Chapitre II et III**) ou entre les mélanges binaires et leurs composants (**Chapitre III**) devraient se traduire par des similarités ou des différences dans les patrons d'activation glomérulaire de ces odeurs dans le LA de la fourmi *Camponotus aethiops* (**Figure 15**). Nous proposons par exemple que lorsque l'*overshadowing* se produit, le patron d'activation du mélange d'odeurs dans le LA serait similaire à celui du composant dominant. En revanche, lorsqu'il n'y a pas d'*overshadowing* manifesté sur le plan comportemental, le patron d'activation du mélange devrait être plutôt similaire à la combinaison des patrons d'activation évoqués par chacun des composants du mélange. Ces similarités ou différences dans la représentation des odeurs dans le LA, pourraient être induites à différents niveaux du traitement de l'information olfactive (voir Introduction, sections **II.3a** et **b** pour une description détaillée du traitement des odeurs chez les insectes).



Au niveau périphérique, les molécules odorantes vont en premier lieu se lier à des RO spécifiques. Cependant, ces derniers sont faiblement sélectifs aux molécules odorantes (i.e. plusieurs molécules peuvent se lier à plusieurs RO). On peut donc imaginer que des aldéhydes différant peu entre eux, en termes de longueur de chaîne carbonée, puissent activer les mêmes RO et donc induire des patrons d'activation similaires au niveau du LA. Inversement, des aldéhydes ayant des longueurs de chaîne carbonée très différentes (différence de plusieurs carbones) n'activeraient pas les mêmes types de récepteurs et donc induiraient des patrons d'activation très différents (**Figure 15**, panel de gauche). Cette hypothèse s'appuie sur des travaux chez les vertébrés ayant montré que des NRO détectaient des aldéhydes avec des longueurs de chaîne carbonée successives et que la proportion de NRO discriminant deux aldéhydes était corrélée à la différence du nombre de carbones entre ces aldéhydes (Zhao et al., 1998; Kaluza & Breer, 2000). De plus, des études d'imagerie et d'électrophysiologie ont montré que dans le BO des vertébrés et le LA des insectes, la similarité entre les patrons d'activation de séries homologues de molécules odorantes (e.g., aldéhydes) dépendait de la similarité chimique des composés en termes de longueur de chaîne carbonée (Döving, 1966; Imamura et al., 1992; Mori et al., 1992; Sato et al., 1994; Yokoi et al., 1995; Johnson et al., 1999; Rubin & Katz, 1999; Sachse et al., 1999; Johnson & Leon, 2000; Kaluza & Breer, 2000; Uchida et al., 2000; Meister & Bonhoeffer, 2001; Belluscio & Katz, 2001; Xu et al., 2003; Daly et al., 2004b; Guerrieri et al., 2005; Johnson et al., 2009).

Du fait de la faible sélectivité des RO, on peut imaginer que les molécules odorantes composant un mélange puissent entrer en compétition pour le même site de liaison au RO (ou des sites de liaison au même récepteur qui se chevauchent) (Akers & Getz, 1993; Duchamp-Viret et al., 2003; Chaput et al., 2012) et donc que des interactions syntopiques entre les molécules odorantes puissent se produire (Rospars et al., 2008; Münch et al., 2013; Szyszka & Stierle, 2014) (**Figure 15**, panel de droite). Ainsi, « seul » un des composants du mélange binaire (celui qui domine) activerait des NRO : le patron d'activation glomérulaire du mélange serait donc celui du composant dominant. Bien évidemment, ceci est une caricature. Le composé dominé pourrait lui-aussi se lier occasionnellement au récepteur. De plus, les deux composants du mélange ne se lient pas nécessairement exactement aux mêmes récepteurs (i.e. les deux composants du mélange se lient à des récepteurs communs

mais un des composants peut se lier à des récepteurs auxquels l'autre composant ne peut se lier). Ceci expliquerait pourquoi l'animal pourrait tout de même répondre au composé dominé. En effet, lorsqu'il y avait *overshadowing*, le niveau réponse au composé dominé n'était pas nécessairement nul. Dans le cadre des interactions syntopiques, nous proposons que les dimensions chimiques des composants d'un mélange tel que le groupe fonctionnel et la chaîne carbonée pourrait ainsi déterminer l'issue de la compétition entre composants pour l'occupation du site du récepteur (e.g., dans notre cas, un alcool mélangé à un aldéhyde ayant une longueur de chaîne carbonée identique ou plus courte que la sienne, gagnerait la compétition pour la liaison au récepteur).

Au niveau central, les glomérules du LA sont interconnectés par l'intermédiaire des NL (majoritairement inhibiteurs) qui participent de manière critique au traitement de l'information olfactive (Sachse & Galizia, 2002; Silbering et al., 2008). Ces interneurons contribuent à la construction des patrons d'activation glomérulaire des odeurs. Ainsi, dans le cadre de la généralisation, ils pourraient modeler les patrons d'activation glomérulaire des odeurs simples de sorte à ce que ces patrons deviennent plus similaires (généralisation) ou plus dissimilaires (discrimination) entre eux (**Figure 15**, panel de gauche). Dans le cadre des mélanges d'odeurs, des études ont montré que le patron d'activation glomérulaire d'un mélange binaire au niveau des afférences du LA (NRO) était similaire à la somme des patrons évoqués par les composants du mélange (Joerges et al., 1997; Deisig et al., 2006; Carlsson et al., 2007; Silbering & Galizia, 2007; Kuebler et al., 2012). Cependant, au niveau des efférences du LA (PN), les patrons obtenus s'écartaient de la simple somme des patrons d'activation de chacun des composants, certainement en raison de l'activation des NL (Silbering & Galizia, 2007; Deisig et al., 2010; Kuebler et al., 2012). Les NL pourraient ainsi modeler le patron d'activation du mélange de sorte à ce qu'il soit plus similaire à un des composants (celui qui domine) plutôt qu'à l'autre (**Figure 15**, panel de droite).

Enfin, des rétroactions de la part des CP vers le LA (Heisenberg, 1998) pourraient également moduler la représentation des odeurs dans le LA, donnant ainsi lieu à des représentations similaires ou dissimilaires entre des odeurs simples ou entre le mélange binaire et ses composants.

Dans la mesure où dans nos expériences sur la similarité perceptuelle et l'*overshadowing*, les fourmis ont été soumises à un conditionnement absolu ou différentiel, nous ne pouvons exclure l'effet de l'apprentissage sur la représentation des odeurs au sein du système nerveux. En effet, des études ont montré qu'un apprentissage olfactif pouvait modifier la représentation des odeurs dans le LA (Faber et al., 1999; Yu et al., 2004; Fernandez et al., 2009; mais voir, Peele et al., 2006). Dans le cas de l'*overshadowing*, on peut ainsi supposer qu'après un conditionnement absolu, le patron d'activation glomérulaire évoqué par un mélange pourrait devenir, du fait du conditionnement, plus similaire à celui du composant dominant et résulter ainsi en un *overshadowing*.

L'amélioration des capacités de discrimination perceptuelle induite par un conditionnement différentiel (**Chapitre II**) pourrait aussi provenir de ces modifications dans la représentation des odeurs induites par un apprentissage. En effet, nous pouvons penser qu'après un conditionnement différentiel, les patrons d'activation glomérulaire des odeurs deviennent moins similaires (i.e. ils se chevauchent moins), résultant ainsi en une meilleure discrimination de la part des fourmis. Cette hypothèse est supportée par des travaux chez l'insecte ayant montré qu'un apprentissage différentiel induisait une « décorrélation » des représentations neurales des odeurs dans le LA (Faber et al., 1999; Daly et al., 2004a; Fernandez et al., 2009; Rath et al., 2011), ou dans les CP (Barth et al., 2014; Lin et al., 2014). Cette « décorrélation » de la représentation des odeurs dans le LA pourrait provenir de l'action des NL puisqu'il a été montré qu'ils étaient nécessaires à la discrimination des odeurs similaires mais pas des odeurs non-similaires (Stopfer et al., 1997; Barth et al., 2014). Dans les CP, la « décorrélation » pourrait provenir d'une boucle de rétroaction entre les cellules de Kenyon des CP et des neurones GABAergiques, puisqu'il a été montré que cette boucle de rétroaction était nécessaire, chez la drosophile, pour apprendre à discriminer des odeurs similaires mais pas pour des odeurs non-similaires (Lin et al., 2014).

Les techniques d'analyse fonctionnelle disponibles chez la fourmi, telle que l'imagerie calcique (Galizia et al., 1999b; Zube et al., 2008; Dupuy et al., 2010; Kuebler et al., 2010; Brandstaetter et al., 2010, 2011; Brandstaetter & Kleineidam, 2011), permettraient de mettre à l'épreuve l'ensemble des différentes hypothèses que nous venons de formuler. En effet, dans le cadre de la généralisation et de l'effet de la procédure de conditionnement sur les performances de discrimination, nous pourrions par exemple enregistrer la réponse aux

aldéhydes que nous avons utilisés, avant et après des conditionnements absolu et différentiel. Ceci nous permettrait de savoir si la similarité dans les patrons d'activation glomérulaires est corrélée à la similarité perceptuelle que nous avons observée d'un point de vue comportemental. De plus, nous pourrions voir si le conditionnement induit une « décorrélation » des patrons d'activation glomérulaires du fait d'une certaine forme d'excitation et d'inhibition induites par le SC+ et le SC-, respectivement. Dans le cadre des mélanges binaires, nous pourrions enregistrer la réponse au mélange d'odeurs et celle de ses composants avant et après un conditionnement absolu, afin de déterminer si lorsque nous observons le phénomène d'*overshadowing* à l'échelle comportementale, la réponse au mélange est plus similaire à celle du composant dominant qu'à celle du composé dominé ou qu'à celle de la somme des représentations neurales des deux composants, et si cet effet est induit par un conditionnement.

Conclusion

Les travaux conduits dans cette thèse ont eu pour objectif de progresser dans nos connaissances sur les mécanismes contribuant à l'émergence de la division du travail, l'apprentissage et la perception des odeurs chez la fourmi *Camponotus aethiops*.

L'approche comportementale que nous avons adoptée a permis de mettre en évidence que la sensibilité au sucre était corrélée aux tâches comportementales effectuées au sein de la colonie, argumentant ainsi en faveur du modèle des seuils de réponse expliquant l'émergence de la division du travail chez les insectes sociaux. Parmi les différentes perspectives que nous avons évoquées, nous pensons que les futures recherches dans ce domaine devraient étudier la contribution des différentes amines biogènes dans la différenciation comportementale et dans la variabilité interindividuelle dans les seuils de réponse au sucre chez *Camponotus aethiops*.

Nos travaux ont également révélé que la sensibilité au sucre et la caste comportementale étaient des facteurs déterminants dans les performances d'apprentissage olfactif appétitif. Dans ce contexte, il sera également important de déterminer si d'autres facteurs tels la sensibilité aux odeurs, la procédure et les paramètres du conditionnement jouent aussi un rôle clé dans les performances d'apprentissage.

Les études menées sur la perception des odeurs simples et des mélanges binaires ont révélé que les propriétés chimiques des molécules odorantes (chaîne carbonée et groupe fonctionnel) et l'expérience olfactive occupaient une place centrale dans la perception et la similarité perceptuelle des odeurs générales. Les futures recherches dans ces domaines devront préciser si les paramètres des différents protocoles de conditionnement peuvent influencer la perception des odeurs, comme nos résultats semblent le suggérer. Des expériences comparables à celle que nous avons menées, employant des odeurs sociales telles que les hydrocarbures cuticulaires, revêtiraient d'une pertinence particulière pour affiner notre compréhension des mécanismes de perception des signatures chimiques impliquées dans la reconnaissance coloniale chez les fourmis. Enfin, l'usage de techniques d'enregistrement cérébral, nous permettrait de comprendre comment les phénomènes

Conclusion

perceptuels que nous avons observés à l'échelle comportementale, trouvent leur place au sein des réseaux neuronaux dédiés au traitement et à l'apprentissage des informations olfactives.

Nos études sur la spécialisation comportementale, les performances d'apprentissage et la perception des odeurs chez la fourmi offrent de nombreuses pistes pour comprendre le succès écologique remarquable de ces insectes.

Annexes

Annexes I

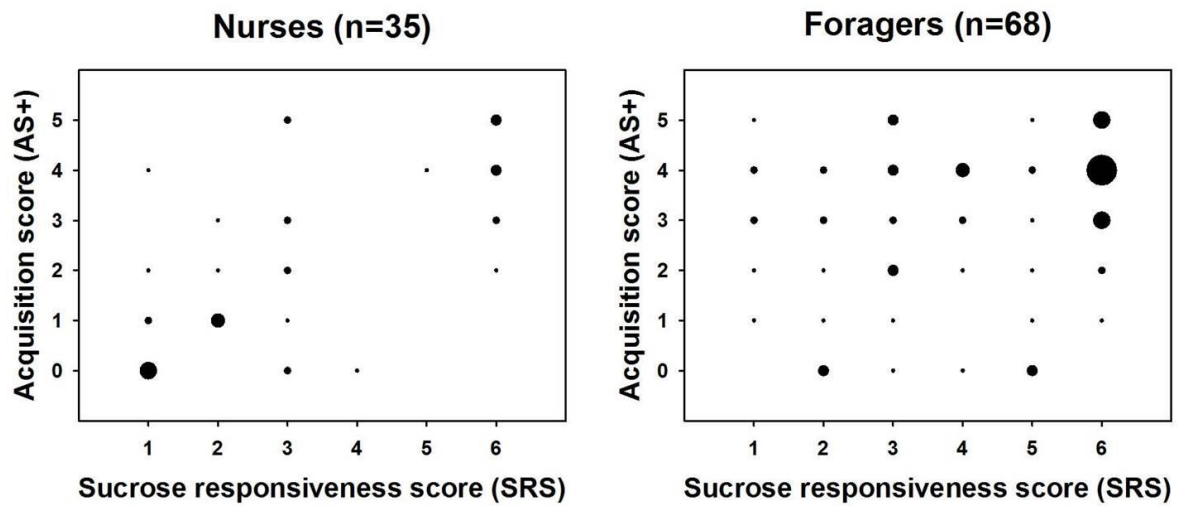


Figure 1: Correlation between sucrose responsiveness score (SRS) and acquisition score to the CS+ (AS+) for nurses (left) and foragers (right). Correlation between SRS and AS+ is highly significant for nurses (Spearman rank correlation test, $r_s=0.62$; $p<0.0001$) but tend to be significant for foragers ($r_s=0.28$; $p=0.055$). Note that foragers have typically high AS+ values even with low SRS values, thus showing their high learning success.

Annexes II

Chemical analysis of the Dufour's, poison and mandibular glands content in the ant *Camponotus aethiops*

Here we analysed the content of the Dufour's, the poison and the mandibular glands in the worker *Camponotus aethiops* with three different techniques of extraction with the aim of uncovering whether the odours used as stimuli in our bioassays were part of the components contained in these glands. None of the odours used were found in these glands.

Material and Methods

Ants

Three colonies of *C. aethiops* were collected in April 2013 at Pompertuzat (Midi-Pyrénées, France, latitude 43.5°, longitude 1.516667°) and kept in the laboratory (25°C, light-dark cycle= 12:12, 70% humidity) in artificial nests composed of two plastic boxes connected by a plastic hose. One of the boxes was covered by cardboard and contained a plaster floor to form the nest; the other box, exposed to light constituted the foraging arena. The inner sides of the two boxes were coated with Fluon® to prevent ants from escaping. Ants were fed twice a week with carbohydrates, protein and vitamins (Bhatkar & Whitcomb, 1970); water was provided *ad libitum*. The analysis of the gland contents in three colonies allowed us to increase the chance of finding minor constituents as in the case of the Dufour's gland for instance, the glandular secretion can be colony specific in terms of components quantity (Traniello, 1980).

Sample preparation

Media workers were collected in the foraging arena and left in a box (10 cm of diameter) during 1h in order to recover from the stress of collection. Ants were then killed by placing the box in a freezer for a few minutes. We gently placed ants in the freezer without disturbing them so to ensure that they did not unload the glands, allowing thus to have enough glandular content for the analyses. This method seemed to be appropriate as few ants showed unload glands (or glands that were not completely full). Only full glands were kept for analyses. Ants were dissected in water under a binocular (see Figure 1 for the location of these glands in *Formicine* ants).

Three Dufour's and poison glands from ants of the same colony were placed together in 2ml glass vials provided with a 200 μ l glass insert; nine samples were collected for each colony (n=81 ants in total). Dufour's and poison glands were analysed together as the aim of the study was not to identify the content of each gland particularly but to investigate whether the odours used in this thesis were present in the glands. Three to ten mandibular glands (n=48 glands in total) were also pooled in 2ml glass vials provided with a 200 μ l glass insert.

The glandular contents were analysed with gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), employing three different techniques: solvent injection, solid-phase microextraction (SPME)-headspace and SPME-rubbing (see below), except for the mandibular glands content that was only analysed with the solvent injection and SPME-headspace techniques due to the small size of the glands. For all techniques, we used an Agilent 7890A gas-chromatograph, equipped with an HP- 5MS capillary column (30 m $\times$ 25 μ m, 0.25 μ m thickness) and a split-splitless injector, coupled to a 5975 Agilent Mass Spectrometer operated at 70 eV in the electron impact ionization mode. The carrier gas was helium at 1 ml.min⁻¹. The column oven was programmed as follows: an initial hold of 5 min at 50°C, then increased to 200°C at 6°C.min⁻¹, to 320°C at 30°C.min⁻¹, and then held for 10 min.

Liquid injection with solvent

Extraction of the glandular content was performed by adding 200 µl of pentane in each vial. Then, 2µl of this extract were manually injected into the GC-MS.

SPME-headspace

Extraction of the glandular content by SPME was performed with a 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS) fiber (Sigma Aldrich, France) in the headspace of the vials at room temperature for 5 min. The fiber was then injected into the GC-MS.

SPME-rubbing

Extraction of the glandular content by SPME was performed with a 100 µm PDMS fiber (Sigma Aldrich, France) by carefully smashing and rubbing the glands against the fiber for 1 min. The fiber was then injected into the GC-MS.

Odours

Each odour used in this thesis was diluted in pentane before being analysed with the GC-MS. For the solvent injection technique, the final odour concentration was 40ng.ml⁻¹ and 2µl of solution were manually injected into the GC-MS; whereas for the SPME-headspace technique the final odour concentration was 20ng.ml⁻¹. The program temperature was the same as for gland extracts.

Peak identification

For all techniques, compounds found in the glands were identified on the basis of their mass spectra and retention time, and compared with standards and published results on *C. aethiops* glandular contents (Ali et al., 1988a). Mass spectra of synthetic compounds used as stimuli in bioassays in this thesis were recovered from Pherobase (www.pherobase.com) and compared with the mass spectra obtained with solvent injection and SPME-headspace techniques.

Results

Odours

All odours used in this thesis were successfully identified with liquid extraction and SPME-headspace techniques on the basis of their known mass spectra available on Pherobase. For instance, the mass spectra of nonanal obtained with both techniques and on Pherobase are shown in Figure 2.

Dufour's and poison glands content

All the three techniques used gave similar results, i.e. the same main peaks were present in all chromatograms. However, a higher number of peaks were detected with the SPME-rubbing technique (Figure 3). We therefore choose to only present the data obtained with this technique (Figure 4). The three colonies gave similar results with variation of the quantity for some compounds. Due to small sample size, any colonial analysis would not be appropriate.

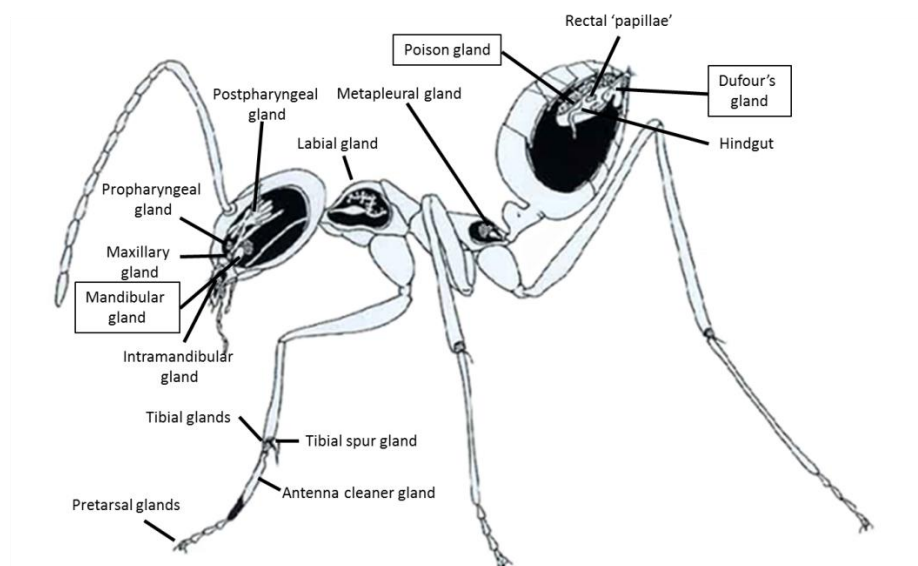


Figure 1: Schematic drawing of a Formicine ant. Exocrine glands that can typically found in workers are indicated. Boxed texts represent the glands analysed in our study. Adapted from Wenseleers et al. (1998).

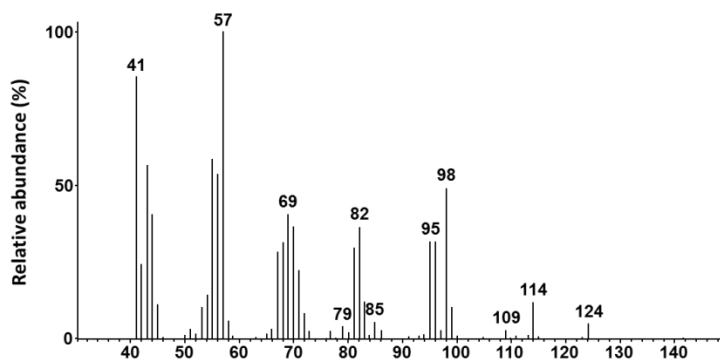
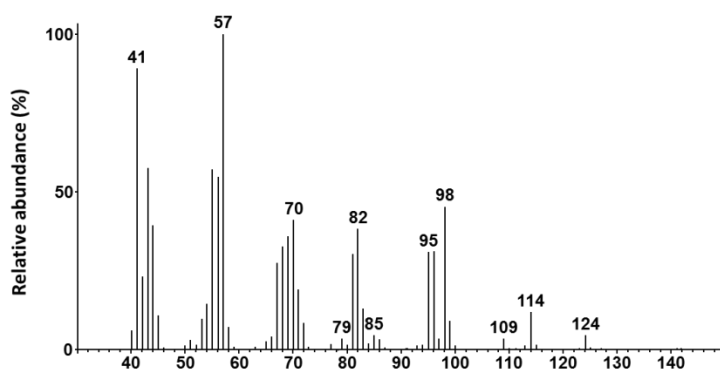
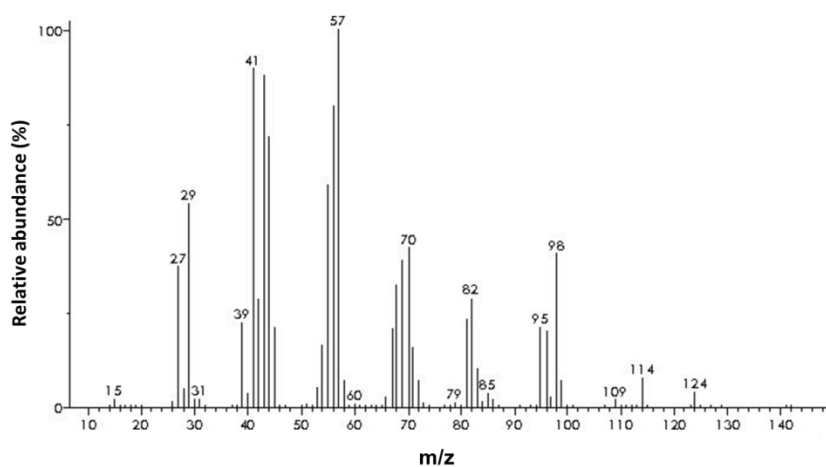
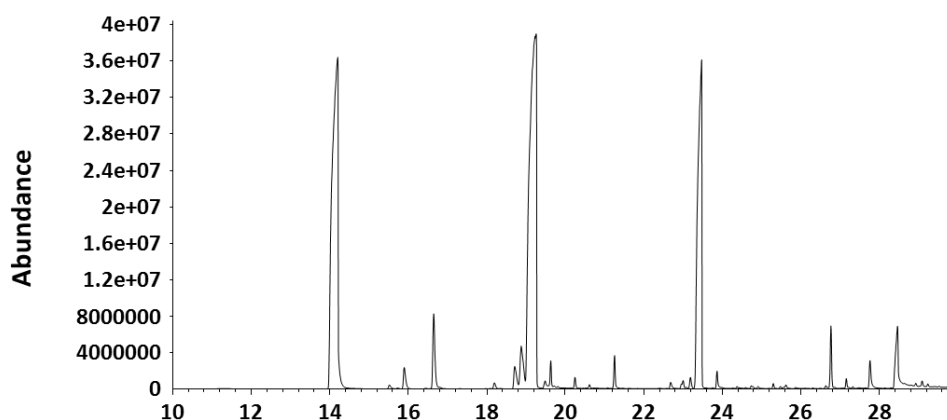
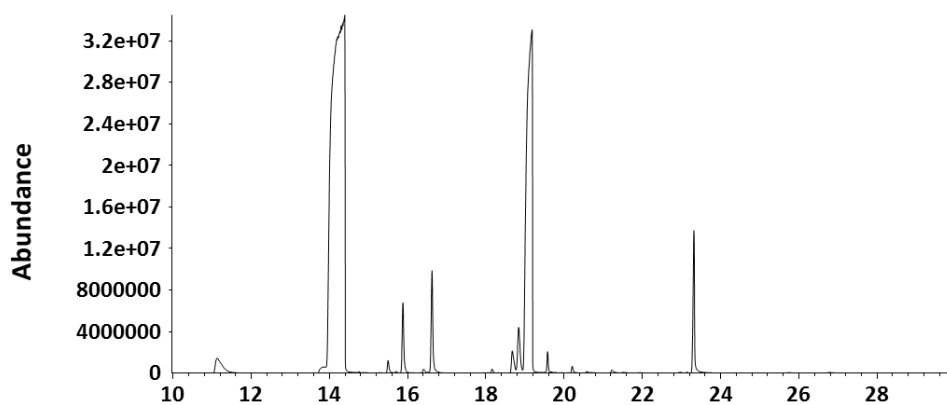
A) Nonanal (SPME-headspace)**B) Nonanal (liquid injection)****C) Nonanal (Pherobase)**

Figure 2: Mass spectrum of nonanal. Mass spectrum obtained from (A) SPME-headspace, (B) liquid injection with solvent and (C) recovered from Pherobase (www.pherobase.com). Mass spectra are comparable therefore nonanal can successfully be identified with the techniques used in our experiment.

A) SPME-rubbing



B) SPME-headspace



C) Liquid injection with solvent

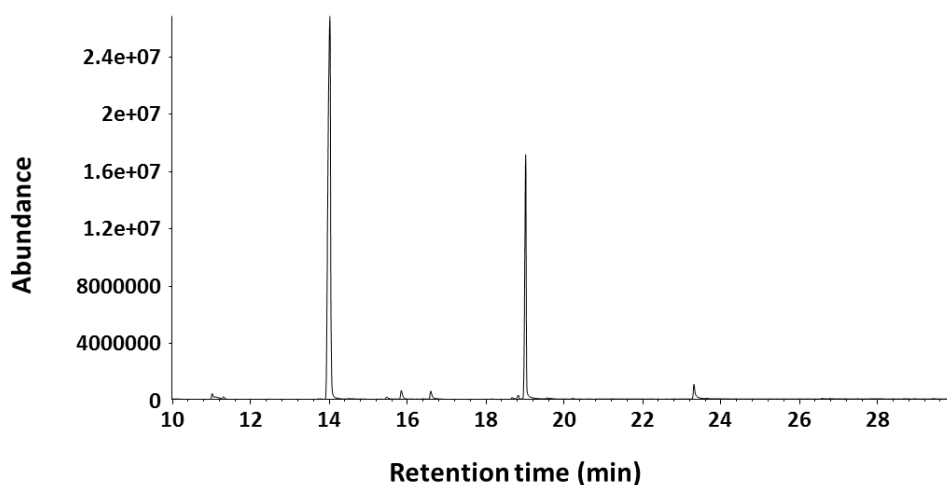


Figure 3: Typical chromatograms of volatiles from three Dufour's and poison glands of *C. aethiops* workers. Chromatograms obtained by (A) SPME-rubbing, (B) SPME-headspace and (C) liquid injection with solvent techniques. The three techniques give similar results, i.e. the same main peaks were present in all chromatograms. However, a higher number of peaks were detected with the SPME-rubbing technique.

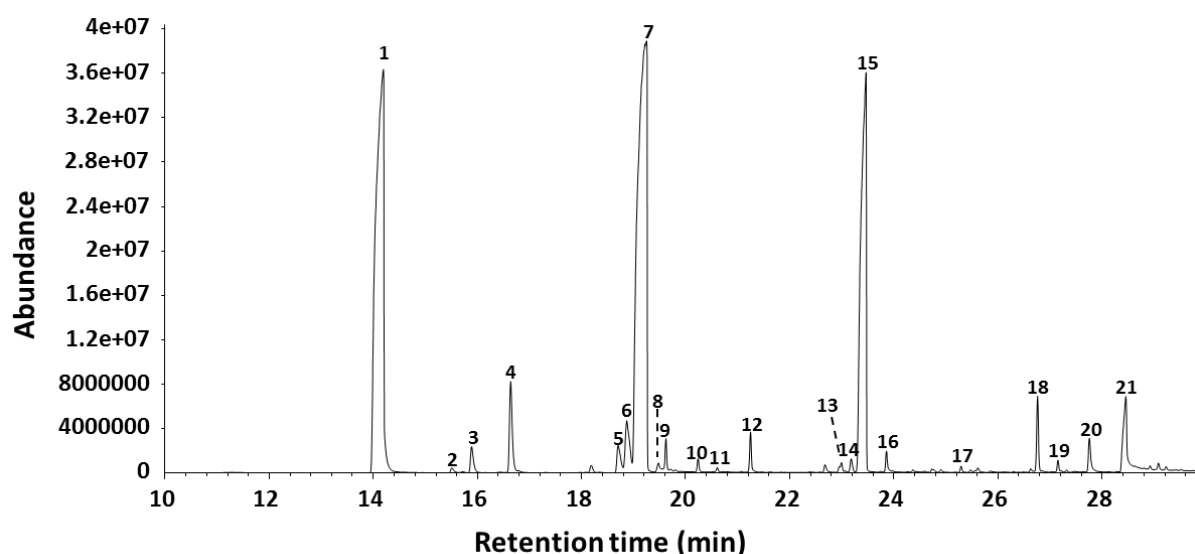


Figure 4: Chromatogram and identification of volatiles from three Dufour's and poison glands of *C. aethiops* workers obtained with the SPME-rubbing technique. Components are identified as follow: **1** C₁₁; **2** 7MeC₁₁; **3** 9MeC₁₁; **4** C₁₂; **5** C_{13:1}*; **6** C_{13:1}*; **7** C₁₃; **8** unknown; **9** unknown; **10** 9MeC₁₃; **11** 3MeC₁₃; **12** C₁₄; **13** C_{15:1}*; **14** C_{15:1}; **15** C₁₅; **16** unknown; **17** C₁₆; **18** C_{17:1}; **19** C₁₇; **20** unknown; **21** unknown. Dufour's and poison glands analyses reveal the presence of three major components: n-undecane, n-tridecane and n-pentadecane. All components, even the smallest peaks that were detected by GC-MS (not necessarily numbered) were compared with the mass spectrum of each odour used in bioassays as stimuli in this thesis in order to verify their presence or their absence. None of the odour used were found in the Dufour's and poison glands contents. Different isomers of the same compound are indicated with “*”.

Références

A

- Abel, R., Rybak, J. & Menzel, R.** (2001). Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* **437**, 363–383.
- Ache, B.W. & Young, J.M.** (2005). Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* **48**, 417–430.
- Agosti, D. & Johnson, N.F.** (2005). Antbase. World Wide Web electronic publication. antbase.org. Available at: <http://antbase.org/> [Accessed October 18, 2014].
- Akers, R.P. & Getz, W.M.** (1993). Response of olfactory receptor neurons in honeybees to odorants and their binary mixtures. *J Comp Physiol A* **173**, 169–185.
- Alekseyenko, O.V., Lee, C. & Kravitz, E.A.** (2010). Targeted manipulation of serotonergic neurotransmission affects the escalation of aggression in adult male *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **5**, e10806.
- Ali, M.F., Attygalle, A.B., Billen, J.P.J. & Morgan, E.D.** (1988a). Contents of Dufour glands in some formicine ants: queens and workers of *Camponotus aethiops* and a re-examination of *Lasius fuliginosus*. *Entomol Exp Appl* **46**, 109–115.
- Ali, M.F., Billen, J.P.J., Jackson, B.D. & Morgan, E.D.** (1988b). Secretion of the Dufour glands of two african desert ants, *Camponotus aegyptiacus* and *Cataglyphis savignyi* (Hymenoptera: Formicidae). *Biochem Syst Ecol* **16**, 647–654.
- Aonuma, H. & Watanabe, T.** (2012). Octopaminergic system in the brain controls aggressive motivation in the ant, *Formica japonica*. *Acta Biol Hung* **63**, 63–68.
- Avarguès-Weber, A. & Giurfa, M.** (2014). Cognitive components of color vision in honey bees: how conditioning variables modulate color learning and discrimination. *J Comp Physiol A* **200**, 449–461.
- Ayre, G.L. & Blum, M.S.** (1971). Attraction and alarm of ants (*Camponotus* spp.-Hymenoptera: Formicidae) by peromones. *Physiol Zool* **44**, 77–83.

B

- Barela, P.B.** (1999). Theoretical mechanisms underlying the trial-spacing effect in Pavlovian fear conditioning. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **25**, 177–193.

- Barth, J., Dipt, S., Pech, U., Hermann, M., Riemensperger, T. & Fiala, A.** (2014). Differential associative training enhances olfactory acuity in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* **34**, 1819–1837.
- Beckers, R., Deneubourg, J.L. & Goss, S.** (1993). Modulation of trail laying in the ant *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae) and its role in the collective selection of a food source. *J Insect Behav* **6**, 751–759.
- Beckers, R., Goss, S., Deneubourg, J.L. & Pasteels, J.M.** (1989). Colony size, communication and ant foraging strategy. *Psyche J Entomol* **96**, 239–256.
- Beckers, R., Lachaud, J.P. & Fresneau, D.** (1994). The influence of olfactory conditioning on food preference in the ant *Lasius niger* (L.). *Ethol Ecol Evol* **6**, 159–167.
- Belluscio, L. & Katz, L.C.** (2001). Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *J Neurosci* **21**, 2113–2122.
- Benton, R.** (2006). On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cell Mol Life Sci CMLS* **63**, 1579–1585.
- Beshers, S.N. & Fewell, J.H.** (2001). Models of division of labor in social insects. *Annu Rev Entomol* **46**, 413–440.
- Bhagavan, S., Benatar, S., Cobey, S. & Smith, B.H.** (1994). Effect of genotype but not of age or caste on olfactory learning performance in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim Behav* **48**, 1357–1369.
- Bhatkar, A. & Whitcomb, W.H.** (1970). Artificial diet for rearing various species of ants. *Fla Entomol* **53**, 229.
- De Biseau, J.C., Deneubourg, J.L. & Pasteels, J.M.** (1991). Collective flexibility during mass recruitment in the ant *Myrmica sabuleti* (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche J Entomol* **98**, 323–336.
- De Biseau, J.-C. & Pasteels, J.M.** (2000). Response thresholds to recruitment signals and the regulation of foraging intensity in the ant *Myrmica sabuleti* (Hymenoptera, Formicidae). *Behav Processes* **48**, 137–148.
- Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A. & Schäfer, S.** (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol* **97**, 107–119.
- Blenau, W. & Baumann, A.** (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* **48**, 13–38.

- Bonabeau, E., Theraulaz, G. & Deneubourg, J.-L.** (1996). Quantitative study of the fixed threshold model for the regulation of division of labour in insect societies. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **263**, 1565–1569.
- Bonabeau, E., Theraulaz, G. & Deneubourg, J.-L.** (1998). Fixed response thresholds and the regulation of division of labor in insect societies. *Bull Math Biol* **60**, 753–807.
- Bos, N., Dreier, S., Jørgensen, C.G., Nielsen, J., Guerrieri, F.J. & d’Ettorre, P.** (2012). Learning and perceptual similarity among cuticular hydrocarbons in ants. *J Insect Physiol* **58**, 138–146.
- Bos, N., d’Ettorre, P. & Guerrieri, F.J.** (2013). Chemical structure of odorants and perceptual similarity in ants. *J Exp Biol* **216**, 3314–3320.
- Bos, N., Guerrieri, F.J. & d’Ettorre, P.** (2010). Significance of chemical recognition cues is context dependent in ants. *Anim Behav* **80**, 839–844.
- Brand, J.M., Duffield, R.M., MacConnell, J.G., Blum, M.S. & Fales, H.M.** (1973). caste-specific compounds in male Carpenter ants. *Science* **179**, 388–389.
- Brandstaetter, A.S. & Kleineidam, C.J.** (2011). Distributed representation of social odors indicates parallel processing in the antennal lobe of ants. *J Neurophysiol* **106**, 2437–2449.
- Brandstaetter, A.S., Rössler, W. & Kleineidam, C.J.** (2010). Dummies versus air puffs: efficient stimulus delivery for low-volatile odors. *Chem Senses* **35**, 323–333.
- Brandstaetter, A.S., Rössler, W. & Kleineidam, C.J.** (2011). Friends and foes from an ant brain’s point of view--neuronal correlates of colony odors in a social insect. *PloS One* **6**, e21383.
- Brembs, B., Lorenzetti, F.D., Reyes, F.D., Baxter, D.A. & Byrne, J.H.** (2002). Operant reward learning in aplysia: neuronal correlates and mechanisms. *Science* **296**, 1706–1709.

C

- Cammaerts-Tricot, M.-C.** (1974). Production and perception of attractive pheromones by differently aged workers of *Myrmica rubra* (Hymenoptera Formicidae). *Insectes Sociaux* **21**, 235–247.
- Cammaerts-Tricot, M.-C. & Verhaeghe, J.-C.** (1974). Ontogenesis of trail pheromone production and trail following behaviour in the workers of *Myrmica rubra* L. (Formicidae). *Insectes Sociaux* **21**, 275–282.

- Carlsson, M.A., Chong, K.Y., Daniels, W., Hansson, B.S. & Pearce, T.C.** (2007). Component information is preserved in glomerular responses to binary odor mixtures in the moth *Spodoptera littoralis*. *Chem Senses* **32**, 433–443.
- Chaput, M.A., El Mountassir, F., Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Le Bon, A.M., Perrut, A., Ferry, B. & Duchamp-Viret, P.** (2012). Interactions of odorants with olfactory receptors and receptor neurons match the perceptual dynamics observed for woody and fruity odorant mixtures. *Eur J Neurosci* **35**, 584–597.
- Chen, C.-F.F., Barnes, D.C. & Wilson, D.A.** (2011). Generalized vs. stimulus-specific learned fear differentially modifies stimulus encoding in primary sensory cortex of awake rats. *J Neurophysiol* **106**, 3136–3144.
- Chou, Y.-H., Spletter, M.L., Yaksi, E., Leong, J.C.S., Wilson, R.I. & Luo, L.** (2010). Diversity and wiring variability of olfactory local interneurons in the *Drosophila* antennal lobe. *Nat Neurosci* **13**, 439–449.
- Christensen, T.A., Waldrop, B.R. & Hildebrand, J.G.** (1998). Multitasking in the olfactory system: context-dependent responses to odors reveal dual GABA-regulated coding mechanisms in single olfactory projection neurons. *J Neurosci* **18**, 5999–6008.
- Cleland, T.A., Morse, A., Yue, E.L. & Linster, C.** (2002). Behavioral models of odor similarity. *Behav Neurosci* **116**, 222–231.
- Clyne, P.J., Warr, C.G., Freeman, M.R., Lessing, D., Kim, J. & Carlson, J.R.** (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* **22**, 327–338.
- Cole, P.D. & Adamo, S.A.** (2005). Cuttlefish (*Sepia officinalis*: Cephalopoda) hunting behavior and associative learning. *Anim Cogn* **8**, 27–30.
- Coureaud, G., Gibaud, D., Le Berre, E., Schaal, B. & Thomas-Danguin, T.** (2011). Proportion of odorants impacts the configural versus elemental perception of a binary blending mixture in newborn rabbits. *Chem Senses* **36**, 693–700.
- Couto, A., Alenius, M. & Dickson, B.J.** (2005). Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr Biol* **15**, 1535–1547.
- Cuvillier-Hot, V. & Lenoir, A.** (2006). Biogenic amine levels, reproduction and social dominance in the queenless ant *Streblognathus peetersi*. *Naturwissenschaften* **93**, 149–153.

D

- Daly, K.C., Chandra, S., Durtschi, M.L. & Smith, B.H.** (2001). The generalization of an olfactory-based conditioned response reveals unique but overlapping odour representations in the moth *Manduca sexta*. *J Exp Biol* **204**, 3085–3095.
- Daly, K.C., Christensen, T.A., Lei, H., Smith, B.H. & Hildebrand, J.G.** (2004a). Learning modulates the ensemble representations for odors in primary olfactory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10476–10481.
- Daly, K.C., Wright, G.A. & Smith, B.H.** (2004b). Molecular features of odorants systematically influence slow temporal responses across clusters of coordinated antennal lobe units in the moth *Manduca sexta*. *J Neurophysiol* **92**, 236–254.
- Dartigues, D.** (1978). *Etude du polymorphisme chez Camponotus aethiops Latreille (Hymenoptera Formicidae): Aspects biométrique et biologique* (Thèse 3e cycle. Biologie du comportement). Toulouse, 1978, France.
- Darwin, C.** (1871). *The descent of man, and selection in relation to sex*. New York, D. Appleton and company.
- Daum, I., Schugens, M.M., Ackermann, H., Lutzenberger, W., Dichgans, J. & Birbaumer, N.** (1993). Classical conditioning after cerebellar lesions in humans. *Behav Neurosci* **107**, 748–756.
- Davis, R.L.** (2004). Olfactory learning. *Neuron* **44**, 31–48.
- Davis, R.L.** (2011). Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* **70**, 8–19.
- Deisig, N., Giurfa, M., Lachnit, H. & Sandoz, J.-C.** (2006). Neural representation of olfactory mixtures in the honeybee antennal lobe. *Eur J Neurosci* **24**, 1161–1174.
- Deisig, N., Giurfa, M. & Sandoz, J.C.** (2010). Antennal lobe processing increases separability of odor mixture representations in the honeybee. *J Neurophysiol* **103**, 2185–2194.
- Deisig, N., Lachnit, H. & Giurfa, M.** (2002). The effect of similarity between elemental stimuli and compounds in olfactory patterning discriminations. *Learn Mem Cold Spring Harb N* **9**, 112–121.
- Deisig, N., Sandoz, J.-C., Giurfa, M. & Lachnit, H.** (2007). The trial-spacing effect in olfactory patterning discriminations in honeybees. *Behav Brain Res* **176**, 314–322.
- Dejean, A.** (1990). Influence de l'environnement pre-imaginal et precoce dans le choix du site de nidification de *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Fabr.) (formicidae, ponerinae). *Behav Processes* **21**, 107–125.

- Depickère, S., Fresneau, D. & Deneubourg, J.-L.** (2004). The influence of red light on the aggregation of two castes of the ant, *Lasius niger*. *J Insect Physiol* **50**, 629–635.
- Derby, C.D., Hutson, M., Livermore, B.A. & Lynn, W.H.** (1996). Generalization among related complex odorant mixtures and their components: analysis of olfactory perception in the spiny lobster. *Physiol Behav* **60**, 87–95.
- Detrain, C. & Pasteels, J.M.** (1991). Caste differences in behavioral thresholds as a basis for polyethism during food recruitment in the ant, *Pheidole pallidula* (Nyl.) (Hymenoptera: Myrmicinae). *J Insect Behav* **4**, 157–176.
- Detrain, C. & Pasteels, J.M.** (1992). Caste polyethism and collective defense in the ant, *Pheidole pallidula*: the outcome of quantitative differences in recruitment. *Behav Ecol Sociobiol* **29**, 405–412.
- Djipto-Lordon, C. & Dejean, A.** (1999). Tropical arboreal ant mosaics: innate attraction and imprinting determine nest site selection in dominant ants. *Behav Ecol Sociobiol* **45**, 219–225.
- Dolezal, A.G., Brent, C.S., Hölldobler, B. & Amdam, G.V.** (2012). Worker division of labor and endocrine physiology are associated in the harvester ant, *Pogonomyrmex californicus*. *J Exp Biol* **215**, 454–460.
- Dornhaus, A. & Franks, N.R.** (2008). Individual and collective cognition in ants and other insects (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* **11**, 215–226.
- Döving, K.B.** (1966). An electrophysiological study of odour similarities of homologous substances. *J Physiol* **186**, 97–109.
- Duchamp-Viret, P., Duchamp, A. & Chaput, M.A.** (2003). Single olfactory sensory neurons simultaneously integrate the components of an odour mixture. *Eur J Neurosci* **18**, 2690–2696.
- Dudareva, N., Pichersky, E. & Gershenzon, J.** (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* **135**, 1893–1902.
- Duffield, R.M. & Blum, M.S.** (1975). Identification, role and systematic significance of 3-octanone in the carpenter ant, *Camponotus schaefferi* Whr. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* **51**, 281–282.
- Duffield, R.M., Snelling, R.R., Fales, H.M. & Blum, M.S.** (2009). Mandibular gland chemistry of two Nearctic Species of *Camponotus* (Colobopsis) (Hymenoptera: Formicidae). *J Hymenopt Res* **18**, 140–144.
- Dumpert, K.** (1972). Alarmstoffrezeptoren auf der antenne von *Lasius fuliginosus* (Latr.) (Hymenoptera, Formicidae). *Z Für Vgl Physiol* **76**, 403–425.

- Dupuy, F., Josens, R., Giurfa, M. & Sandoz, J.-C.** (2010). Calcium imaging in the ant *Camponotus fellah* reveals a conserved odour-similarity space in insects and mammals. *BMC Neurosci* **11**, 28.
- Dupuy, F., Sandoz, J.-C., Giurfa, M. & Josens, R.** (2006). Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Anim Behav* **72**, 1081–1091.
- Dyer, A.G. & Chittka, L.** (2004). Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften* **91**, 224–227.

E

- Ehmer, B. & Gronenberg, W.** (2004). Mushroom body volumes and visual interneurons in ants: Comparison between sexes and castes. *J Comp Neurol* **469**, 198–213.
- Erber, J., Masuhr, T. & Menzel, R.** (1980). Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol Entomol* **5**, 343–358.
- d’Ettorre, P. & Lenoir, A.** (2010). In *Ant Ecology*, pp. 194–209. Oxford University Press.

F

- Faber, T., Joerges, J. & Menzel, R.** (1999). Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat Neurosci* **2**, 74–78.
- Falibene, A., de Figueiredo Gontijo, A. & Josens, R.** (2009). Sucking pump activity in feeding behaviour regulation in carpenter ants. *J Insect Physiol* **55**, 518–524.
- Falibene, A. & Josens, R.** (2012). Sucrose acceptance threshold: a way to measure sugar perception in ants. *Insectes Sociaux* **59**, 75–80.
- Falibene, A., Rössler, W. & Josens, R.** (2012). Serotonin depresses feeding behaviour in ants. *J Insect Physiol* **58**, 7–17.
- Fanselow, M.S. & Tighe, T.J.** (1988). Contextual conditioning with massed versus distributed unconditional stimuli in the absence of explicit conditional stimuli. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **14**, 187–199.
- Fernandez, P.C., Locatelli, F.F., Person-Rennell, N., Deleo, G. & Smith, B.H.** (2009). Associative conditioning tunes transient dynamics of early olfactory processing. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **29**, 10191–10202.

- Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.-M., Buchner, E. & Galizia, C.G.** (2002). Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Curr Biol* **12**, 1877–1884.
- Fletcher, M.L. & Wilson, D.A.** (2002). Experience modifies olfactory acuity: acetylcholine-dependent learning decreases behavioral generalization between similar odorants. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **22**, RC201.
- Fonta, C., Sun, X.-J. & Masson, C.** (1993). Morphology and spatial distribution of bee antennal lobe interneurons responsive to odours. *Chem Senses* **18**, 101–119.
- Frost, E.H., Shutler, D. & Hillier, N.K.** (2012). The proboscis extension reflex to evaluate learning and memory in honeybees (*Apis mellifera*): some caveats. *Naturwissenschaften* **99**, 677–686.
- Fujiwara-Tsujii, N., Yamagata, N., Takeda, T., Mizunami, M. & Yamaoka, R.** (2006). Behavioral responses to the alarm pheromone of the ant *Camponotus obscuripes* (Hymenoptera: Formicidae). *Zoolog Sci* **23**, 353–358.

G

- Gadau, J., Gertsch, P.J., Heinze, J., Pamilo, P. & Hölldobler, B.** (1998). Oligogyny by unrelated queens in the carpenter ant, *Camponotus ligniperdus*. *Behav Ecol Sociobiol* **44**, 23–33.
- Gadau, J., Heinze, J., Hölldobler, B. & Schmid, M.** (1996). Population and colony structure of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Mol Ecol* **5**, 785–792.
- Galizia, C.G., Nägler, K., Hölldobler, B. & Menzel, R.** (1998). Odour coding is bilaterally symmetrical in the antennal lobes of honeybees (*Apis mellifera*). *Eur J Neurosci* **10**, 2964–2974.
- Galizia, C.G. & Rössler, W.** (2010). Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. *Annu Rev Entomol* **55**, 399–420.
- Galizia, C.G., Sachse, S. & Mustaparta, H.** (2000). Calcium responses to pheromones and plant odours in the antennal lobe of the male and female moth *Heliothis virescens*. *J Comp Physiol A* **186**, 1049–1063.
- Galizia, C.G., Sachse, S., Rappert, A. & Menzel, R.** (1999a). The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nat Neurosci* **2**, 473–478.

- Galizia, Menzel & Holldobler** (1999b). Optical imaging of odor-evoked glomerular activity patterns in the antennal lobes of the ant *Camponotus rufipes*. *Naturwissenschaften* **86**, 533–537.
- Gerber, B., Wüstenberg, D., Schütz, A. & Menzel, R.** (1998). Temporal determinants of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: nonmonotonous effects of the training trial interval. *Neurobiol Learn Mem* **69**, 71–78.
- Ghirlanda, S. & Enquist, M.** (2003). A century of generalization. *Anim Behav* **66**, 15–36.
- Giraldo, Y.M. & Traniello, J.F.A.** (2014). Worker senescence and the sociobiology of aging in ants. *Behav Ecol Sociobiol* **68**, 1901–1919.
- Giurfa, M.** (2003). Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 726–735.
- Giurfa, M.** (2004). Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften* **91**, 228–231.
- Giurfa, M.** (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J Comp Physiol A* **193**, 801–824.
- Giurfa, M., Fabre, E., Flaven-Pouchon, J., Groll, H., Oberwallner, B., Vergoz, V., Roussel, E. & Sandoz, J.C.** (2009). Olfactory conditioning of the sting extension reflex in honeybees: Memory dependence on trial number, interstimulus interval, intertrial interval, and protein synthesis. *Learn Mem* **16**, 761–765.
- Giurfa, M. & Sandoz, J.-C.** (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learn Mem* **19**, 54–66.
- Goodisman, M.A.D. & Hahn, D.A.** (2004). Colony genetic structure of the ant *Camponotus ocreatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* **44**, 21–33.
- Gronenberg, W.** (1999). Modality-specific segregation of input to ant mushroom bodies. *Brain Behav Evol* **54**, 85–95.
- Gronenberg, W.** (2001). Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. *J Comp Neurol* **435**, 474–489.
- Gronenberg, W.** (2008). Structure and function of ant (Hymenoptera: Formicidae) brains: Strength in numbers. *Myrmecol News* **11**, 25–36.
- Gronenberg, W., Heeren, S. & Hölldobler, B.** (1996). Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *J Exp Biol* **199**, 2011–2019.

- Gronenberg, W. & López-Riquelme, G.O.** (2004). Multisensory convergence in the mushroom bodies of ants and bees. *Acta Biol Hung* **55**, 31–37.
- Grozinger, C.M., Sharabash, N.M., Whitfield, C.W. & Robinson, G.E.** (2003). Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 14519–14525.
- Guerrieri, F.J. & d’Ettorre, P.** (2010). Associative learning in ants: conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *J Insect Physiol* **56**, 88–92.
- Guerrieri, F.J., d’Ettorre, P., Devaud, J.-M. & Giurfa, M.** (2011). Long-term olfactory memories are stabilised via protein synthesis in *Camponotus fellah* ants. *J Exp Biol* **214**, 3300–3304.
- Guerrieri, F.J., Nehring, V., Jørgensen, C.G., Nielsen, J., Galizia, C.G. & d’Ettorre, P.** (2009). Ants recognize foes and not friends. *Proc Biol Sci* **276**, 2461–2468.
- Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M.** (2005). Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol* **3**, e60.
- Guttman, N. & Kalish, H.I.** (1956). Discriminability and stimulus generalization. *J Exp Psychol* **51**, 79–88.

H

- Haak, U., Hölldobler, B., Bestmann, H.J. & Kern, F.** (1996). Species-specificity in trail pheromones and Dufour’s gland contents of *Camponotus atriceps* and *C. floridanus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* **7**, 85–93.
- Haddad, R., Khan, R., Takahashi, Y.K., Mori, K., Harel, D. & Sobel, N.** (2008). A metric for odorant comparison. *Nat Methods* **5**, 425–429.
- Al Haddad, S. & Delage-Darchen, B.** (1994). Orientation et apprentissage chez une fourmi polymorphe: *Camponotus aethiops* Hymenoptera: Formicidae. *Cah Ethologie* **134**, 397–410.
- Hallem, E.A. & Carlson, J.R.** (2004). The odor coding system of *Drosophila*. *Trends Genet* **20**, 453–459.
- Hangartner, W.** (1969). Structure and variability of the individual odor trail in *Solenopsis geminata* Fabr. (Hymenoptera, Formicidae). *Z Für Vgl Physiol* **62**, 111–120.
- Hangartner, W.** (1970). Control of pheromone quantity in odor trails of the ant *Acanthomyops interjectus* MAYR. *Experientia* **26**, 664–665.

- Hannaford, S., Sattler, A., Siegel, J. & Foster, R.L.** (2013). Task specialization and odor effects on proboscis extension conditioning in bumblebees (*Bombus huntii*). *J Insect Behav* **26**, 762–779.
- Hanson, H.M.** (1959). Effects of discrimination training on stimulus generalization. *J Exp Psychol* **58**, 321–334.
- Hefetz, A. & Orion, T.** (1982). Pheromones of ants of Israel. I. The alarm-defense system of some larger Formicinae. *Isr J Entomol*.
- Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Keller, A. & Stocker, R.F.** (2001). A central neural circuit for experience-independent olfactory and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 15336–15341.
- Heisenberg, M.** (1998). What do the mushroom bodies do for the insect brain? an introduction. *Learn Mem Cold Spring Harb N* **5**, 1–10.
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S. & Byers, D.** (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* **2**, 1–30.
- Hildebrand, J.G. & Shepherd, G.M.** (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annu Rev Neurosci* **20**, 595–631.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O.** (1990). *The Ants*, 1st edition. Belknap Press, Cambridge, Mass.
- Honegger, K.S., Campbell, R.A.A. & Turner, G.C.** (2011). Cellular-resolution population imaging reveals robust sparse coding in the *Drosophila* mushroom body. *J Neurosci* **31**, 11772–11785.
- Hoyer, S.C., Liebig, J. & Rössler, W.** (2005). Biogenic amines in the ponerine ant *Harpegnathos saltator*: serotonin and dopamine immunoreactivity in the brain. *Arthropod Struct Dev* **34**, 429–440.
- Hughes, W.O.H. & Goulson, D.** (2001). Polyethism and the importance of context in the alarm reaction of the grass-cutting ant, *Atta capiguara*. *Behav Ecol Sociobiol* **49**, 503–508.
- Imamura, K., Mataga, N. & Mori, K.** (1992). Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. I. Aliphatic compounds. *J Neurophysiol* **68**, 1986–2002.

Inagaki, H.K., Ben-Tabou de-Leon, S., Wong, A.M., Jagadish, S., Ishimoto, H., Barnea, G., Kitamoto, T., Axel, R. & Anderson, D.J. (2012). Visualizing neuromodulation in vivo: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. *Cell* **148**, 583–595.

J

Jaison, P. (1980). Environmental preference induced experimentally in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Nature* **286**, 388–389.

Jefferis, G.S., Potter, C.J., Chan, A.M., Marin, E.C., Rohlfsing, T., Maurer Jr., C.R. & Luo, L. (2007). Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* **128**, 1187–1203.

Jehl, C., Royet, J.P. & Holley, A. (1995). Odor discrimination and recognition memory as a. *Percept Psychophys* **57**, 1002–1011.

Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C.G. & Menzel, R. (1997). Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* **387**, 285–288.

Johnson, B.A. & Leon, M. (2000). Odorant molecular length: One aspect of the olfactory code. *J Comp Neurol* **426**, 330–338.

Johnson, B.A. & Leon, M. (2007). Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. *J Comp Neurol* **503**, 1–34.

Johnson, B.A., Woo, C.C., Hingco, E.E., Pham, K.L. & Leon, M. (1999). Multidimensional chemotopic responses to n-aliphatic acid odorants in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* **409**, 529–548.

Johnson, B.A., Xu, Z., Ali, S.S. & Leon, M. (2009). Spatial representations of odorants in olfactory bulbs of rats and mice: Similarities and differences in chemotopic organization. *J Comp Neurol* **514**, 658–673.

Johnson, R.A. (1991). Learning, memory, and foraging efficiency in two species of desert seed-harvester ants. *Ecology* **72**, 1408.

Jones, J.C., Myerscough, M.R., Graham, S. & Oldroyd, B.P. (2004). Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science* **305**, 402–404.

Josens, R.B., Farina, W.M. & Roces, F. (1998). Nectar feeding by the ant *Camponotus mus*: intake rate and crop filling as a function of sucrose concentration. *J Insect Physiol* **44**, 579–585.

Josens, R., Eschbach, C. & Giurfa, M. (2009). Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants. *J Exp Biol* **212**, 1904–1911.

Junca, P., Carcaud, J., Moulin, S., Garnery, L. & Sandoz, J.-C. (2014). Genotypic influence on aversive conditioning in honeybees, using a novel thermal reinforcement procedure. *PLoS ONE* **9**, e97333.

K

Kahsai, L. & Zars, T. (2011). Learning and memory in *Drosophila*: behavior, genetics, and neural systems. In *International Review of Neurobiology*, ed. Nigel Atkinson, Recent advances in the use of *Drosophila* in neurobiology and neurodegeneration, pp. 139–167. Academic Press.

Kaluza, J.F. & Breer, H. (2000). Responsiveness of olfactory neurons to distinct aliphatic aldehydes. *J Exp Biol* **203**, 927–933.

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

Kamin, L.J. (1968). Attention-like processes in classical conditioning. *Miami Symp Predict Behav Aversive Stimul* 9–31.

Kamin, L.J. (1969). Selective association and conditioning. In *Fundamental Issues in Associative Learning*, ed. Mackintosh NJ & Honig WK, pp. 42–64. Dalhousie University Press, Halifax.

Karaman, C., Aktaş, N. & Kiran, K. (2011). Ants of the genus *Camponotus* Mayr, 1861 (Hymenoptera: Formicidae) in the Kaz Mountains, Turkey, with descriptions of sexuals of *Camponotus candiotes* Emery, 1894 and *Camponotus ionius* Emery, 1920. *Turk J Zool* **35**, 183–197.

Kay, L.M., Crk, T. & Thorngate, J. (2005). A redefinition of odor mixture quality. *Behav Neurosci* **119**, 726–733.

Kelber, C., Rössler, W. & Kleineidam, C.J. (2010). Phenotypic plasticity in number of glomeruli and sensory innervation of the antennal lobe in leaf-cutting ant workers (*A. vollenweideri*). *Dev Neurobiol* **70**, 222–234.

Kelber, C., Rössler, W., Roces, F. & Kleineidam, C.J. (2009). The antennal lobes of fungus-growing ants (Attini): neuroanatomical traits and evolutionary trends. *Brain Behav Evol* **73**, 273–284.

Kirschner, S., Kleineidam, C.J., Zube, C., Rybak, J., Grünwald, B. & Rössler, W. (2006). Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* **499**, 933–952.

- Kleineidam, C.J., Obermayer, M., Halbich, W. & Rössler, W.** (2005). A macroglomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance. *Chem Senses* **30**, 383–392.
- Kleineidam, C.J., Rössler, W., Hölldobler, B. & Roces, F.** (2007). Perceptual differences in trail-following leaf-cutting ants relate to body size. *J Insect Physiol* **53**, 1233–1241.
- Kleineidam, C.J. & Rössler, W.** (2009). Adaptations in the olfactory system of social Hymenoptera. In *Organization of Insect Societies: From Genome to Sociocomplexity*, pp. 194–219. Harvard University Press.
- Kogan, J.H., Frankland, P.W., Blendy, J.A., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schütz, G. & Silva, A.J.** (1997). Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol* **7**, 1–11.
- Kohl, E., Hölldobler, B. & Bestmann, H.J.** (2001). Trail and recruitment pheromones in *Camponotus socius* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* **11**, 67–73.
- Kohl, E., Hölldobler, B. & Bestmann, H.-J.** (2003). Trail pheromones and Dufour gland contents in three *Camponotus* species (*C. castaneus*, *C. balzani*, *C. sericeiventris*: Formicidae, Hymenoptera). *Chemoecology* **13**, 113–122.
- Kostowski, W., Tarchalska-Krynska, B. & Markowska, L.** (1975). Aggressive behavior and brain serotonin and catecholamines in ants (*Formica rufa*). *Pharmacol Biochem Behav* **3**, 717–719.
- Kreher, S.A., Mathew, D., Kim, J. & Carlson, J.R.** (2008). Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron* **59**, 110–124.
- Kuebler, L.S., Kelber, C. & Kleineidam, C.J.** (2010). Distinct antennal lobe phenotypes in the leaf-cutting ant (*Atta vollenweideri*). *J Comp Neurol* **518**, 352–365.
- Kuebler, L.S., Schubert, M., Kárpáti, Z., Hansson, B.S. & Olsson, S.B.** (2012). Antennal lobe processing correlates to moth olfactory behavior. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **32**, 5772–5782.
- Kume, K., Kume, S., Park, S.K., Hirsh, J. & Jackson, F.R.** (2005). Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J Neurosci* **25**, 7377–7384.

L

- Laing, D.G. & Francis, G.W.** (1989). The capacity of humans to identify odors in mixtures. *Physiol Behav* **46**, 809–814.

- Laloi, D., Bailez, O., Blight, M.M., Roger, B., Pham-Delègue, M.-H. & Wadhams, L.J.** (2000). Recognition of Complex Odors by Restrained and Free-Flying Honeybees, *Apis mellifera*. *J Chem Ecol* **26**, 2307–2319.
- Laloi, D., Gallois, M., Roger, B. & Pham-Delègue, M.** (2001). Changes with age in olfactory conditioning performance of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **32**, 231–242.
- Laska, M. & Freyer, D.** (1997). Olfactory discrimination ability for aliphatic esters in squirrel monkeys and Humans. *Chem Senses* **22**, 457–465.
- Laska, M., Galizia, C.G., Giurfa, M. & Menzel, R.** (1999a). Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees. *Chem Senses* **24**, 429–438.
- Laska, M. & Hübener, F.** (2001). Olfactory discrimination ability for homologous series of aliphatic ketones and acetic esters. *Behav Brain Res* **119**, 193–201.
- Laska, M. & Teubner, P.** (1998). Odor structure-activity relationships of carboxylic acids correspond between squirrel monkeys and humans. *Am J Physiol* **274**, R1639–R1645.
- Laska, M. & Teubner, P.** (1999). Olfactory discrimination ability for homologous series of aliphatic alcohols and aldehydes. *Chem Senses* **24**, 263–270.
- Laska, M., Trolp, S. & Teubner, P.** (1999b). Odor structure-activity relationships compared in human and nonhuman primates. *Behav Neurosci* **113**, 998–1007.
- Leal, W.S.** (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding Proteins, and degrading enzymes. *Annu Rev Entomol* **58**, 373–391.
- Lei, H., Christensen, T.A. & Hildebrand, J.G.** (2004). Spatial and temporal organization of ensemble representations for different odor classes in the moth antennal lobe. *J Neurosci* **24**, 11108–11119.
- Lin, A.C., Bygrave, A.M., de Calignon, A., Lee, T. & Miesenböck, G.** (2014). Sparse, decorrelated odor coding in the mushroom body enhances learned odor discrimination. *Nat Neurosci* **17**, 559–568.
- Linster, C. & Hasselmo, M.E.** (1999). Behavioral responses to aliphatic aldehydes can be predicted from known electrophysiological responses of mitral cells in the olfactory bulb. *Physiol Behav* **66**, 497–502.
- Linster, C., Johnson, B.A., Morse, A., Yue, E. & Leon, M.** (2002). Spontaneous versus reinforced olfactory discriminations. *J Neurosci* **22**, 6842–6845.

- Linster, C. & Smith, B.H.** (1997). A computational model of the response of honey bee antennal lobe circuitry to odor mixtures: overshadowing, blocking and unblocking can arise from lateral inhibition. *Behav Brain Res* **87**, 1–14.
- Littledyke, M. & Cherrett, J.M.** (1978). Olfactory responses of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae) in the laboratory. *Bull Entomol Res* **68**, 273–282.
- Livermore, A. & Laing, D.G.** (1998). The influence of chemical complexity on the perception of multicomponent odor mixtures. *Percept Psychophys* **60**, 650–661.
- Li, W., Howard, J.D., Parrish, T.B. & Gottfried, J.A.** (2008). Aversive learning enhances perceptual and cortical discrimination of indiscriminable odor cues. *Science* **319**, 1842–1845.
- Lockhart, M. & Moore, J.W.** (1975). Classical differential and operant conditioning in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with septal lesions. *J Comp Physiol Psychol* **88**, 147–154.
- Long, T.F. & Murdock, L.L.** (1983). Stimulation of blowfly feeding behavior by octopaminergic drugs. *Proc Natl Acad Sci* **80**, 4159–4163.
- López-Riquelme, G.O., Malo, E.A., Cruz-López, L. & Fanjul-Moles, Mar.L.** (2006). Antennal olfactory sensitivity in response to task-related odours of three castes of the ant *Atta mexicana* (hymenoptera: formicidae). *Physiol Entomol* **31**, 353–360.

M

- Mandairon, N. & Linster, C.** (2009). Odor perception and olfactory bulb plasticity in adult mammals. *J Neurophysiol* **101**, 2204–2209.
- Martin, J.P., Beyerlein, A., Dacks, A.M., Reisenman, C.E., Riffell, J.A., Lei, H. & Hildebrand, J.G.** (2011). The neurobiology of insect olfaction: Sensory processing in a comparative context. *Prog Neurobiol* **95**, 427–447.
- Matsumoto, Y. & Mizunami, M.** (2000). Olfactory learning in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J Exp Biol* **203**, 2581–2588.
- Matsumoto, Y. & Mizunami, M.** (2002). Temporal determinants of long-term retention of olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J Exp Biol* **205**, 1429–1437.
- Mazor, O. & Laurent, G.** (2005). Transient dynamics versus fixed points in odor representations by locust antennal lobe projection neurons. *Neuron* **48**, 661–673.

- McAllister, D.E., McAllister, W.R., Brooks, C.I. & Goldman, J.A.** (1972). Magnitude and shift of reward in instrumental aversive learning in rats. *J Comp Physiol Psychol* **80**, 490–501.
- McQuillan, H.J., Barron, A.B. & Mercer, A.R.** (2012). Age- and behaviour-related changes in the expression of biogenic amine receptor genes in the antennae of honey bees (*Apis mellifera*). *J Comp Physiol A* **198**, 753–761.
- Meister, M. & Bonhoeffer, T.** (2001). Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *J Neurosci* **21**, 1351–1360.
- Menzel, R.** (1999). Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* **185**, 323–340.
- Menzel, R.** (2012). The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nat Rev Neurosci* **13**, 758–768.
- Menzel, R., Erber, J. & Masuhr, T.** (1974). Learning and memory in the honeybee. In *Experimental Analysis of Insect Behaviour*, ed. Browne DLB, pp. 195–217. Springer Berlin Heidelberg.
- Menzel, R., Manz, G., Menzel, R. & Greggers, U.** (2001). Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learn Mem* **8**, 198–208.
- Mercer, A.R. & Menzel, R.** (1982). The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *J Comp Physiol* **145**, 363–368.
- Mishra, D., Louis, M. & Gerber, B.** (2010). Adaptive adjustment of the generalization-discrimination balance in larval *Drosophila*. *J Neurogenet* **24**, 168–175.
- Mori, K., Mataga, N. & Imamura, K.** (1992). Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules. *J Neurophysiol* **67**, 786–789.
- Müller, U.** (2012). The molecular signalling processes underlying olfactory learning and memory formation in honeybees. *Apidologie* **43**, 322–333.
- Münch, D., Schmeichel, B., Silbering, A.F. & Galizia, C.G.** (2013). Weaker ligands can dominate an odor blend due to syntopic interactions. *Chem Senses* **38**, 293–304.
- Muscedere, M.L., Johnson, N., Gillis, B.C., Kamhi, J.F. & Traniello, J.F.A.** (2012). Serotonin modulates worker responsiveness to trail pheromone in the ant *Pheidole dentata*. *J Comp Physiol A* **198**, 219–227.

- Muscedere, M.L. & Traniello, J.F.A.** (2012). Division of labor in the hyperdiverse ant genus *Pheidole* is associated with distinct subcaste- and age-related patterns of worker brain organization. *PLoS ONE* **7**, e31618.
- Mysore, K., Shyamala, B.V. & Rodrigues, V.** (2010). Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus compressus* (Fabricius, 1787). *Arthropod Struct Dev* **39**, 310–321.
- Mysore, K., Subramanian, K.A., Sarasij, R.C., Suresh, A., Shyamala, B.V., VijayRaghavan, K. & Rodrigues, V.** (2009). Caste and sex specific olfactory glomerular organization and brain architecture in two sympatric ant species *Camponotus sericeus* and *Camponotus compressus* (Fabricius, 1798). *Arthropod Struct Dev* **38**, 485–497.
- N**
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F. & Nishikawa, M.** (2009). Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell Tissue Res* **338**, 79–97.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F. & Nishikawa, M.** (2010). Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: glomerular organizations of antennal lobes. *J Comp Neurol* **518**, 2186–2201.
- Niewalda, T., Völler, T., Eschbach, C., Ehmer, J., Chou, W.-C., Timme, M., Fiala, A. & Gerber, B.** (2011). A combined perceptual, physico-chemical, and imaging approach to “odour-distances” suggests a categorizing function of the *Drosophila* antennal lobe. *PLoS ONE* **6**, e24300.
- Nishikawa, M., Nishino, H., Misaka, Y., Kubota, M., Tsuji, E., Satoji, Y., Ozaki, M. & Yokohari, F.** (2008). Sexual dimorphism in the antennal lobe of the ant *Camponotus japonicus*. *Zoolog Sci* **25**, 195–204.
- Nishikawa, M., Watanabe, H. & Yokohari, F.** (2012). Higher brain centers for social tasks in worker ants, *Camponotus japonicus*. *J Comp Neurol* **520**, 1584–1598.
- Norman, R.J., Buchwald, J.S. & Villablanca, J.R.** (1977). Classical conditioning with auditory discrimination of the eye blink in decerebrate cats. *Science* **196**, 551–553.

O

- O'Donnell, S. & Foster, R.L.** (2001). Thresholds of response in nest thermoregulation by worker bumble bees, *Bombus bifarius nearcticus* (Hymenoptera: Apidae). *Ethology* **107**, 387–399.
- O'Donnell, S. & Jeanne, R.L.** (1993). Methoprene accelerates age polyethism in workers of a social wasp (*Polybia occidentalis*). *Physiol Entomol* **18**, 189–194.
- Okada, R., Sakura, M. & Mizunami, M.** (2003). Distribution of dendrites of descending neurons and its implications for the basic organization of the cockroach brain. *J Comp Neurol* **458**, 158–174.
- Olsen, S.R. & Wilson, R.I.** (2008). Lateral presynaptic inhibition mediates gain control in an olfactory circuit. *Nature* **452**, 956–960.
- Oster, G.F. & Wilson, E.O.** (1978). *Caste and Ecology in the Social Insects*. Princeton University Press.

P

- Page, R.E. & Erber, J.** (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* **89**, 91–106.
- Page, R.E., Erber, J. & Fondrk, M.K.** (1998). The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* **182**, 489–500.
- Page, R.E., Scheiner, R., Erber, J. & Amdam, G.V.** (2006). The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). In *Current Topics in Developmental Biology*, ed. Gerald P. Schatten, pp. 253–286. Academic Press.
- Pankiw, T., Nelson, M., Page, R.E. & Fondrk, M.K.** (2004). The communal crop: modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality. *Behav Ecol Sociobiol* **55**, 286–292.
- Pankiw, T. & Page, R.E.** (2000). Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. *Behav Ecol Sociobiol* **47**, 265–267.
- Pankiw, T. & Page, R.E.** (2001). Brood pheromone modulates honeybee (*Apis mellifera* L.) sucrose response thresholds. *Behav Ecol Sociobiol* **49**, 206–213.

Références

- Pankiw, T. & Page, R.E.** (2003). Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* **189**, 675–684.
- Pankiw, T., Waddington, K.D. & Page, R.E.** (2001). Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. *J Comp Physiol A* **187**, 293–301.
- Pavlov, I.** (1927). *Conditioned reflexes an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford University Press Humphrey Milford, [London].
- Pearce, J.M.** (1987). A model for stimulus generalization in Pavlovian conditioning. *Psychol Rev* **94**, 61–73.
- Peele, P., Ditzen, M., Menzel, R. & Galizia, C.G.** (2006). Appetitive odor learning does not change olfactory coding in a subpopulation of honeybee antennal lobe neurons. *J Comp Physiol A* **192**, 1083–1103.
- Pelz, C., Gerber, B. & Menzel, R.** (1997). Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *J Exp Biol* **200**, 837–847.
- Perez-Orive, J., Mazor, O., Turner, G.C., Cassenaer, S., Wilson, R.I. & Laurent, G.** (2002). Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science* **297**, 359–365.
- Perisse, E., Burke, C., Huetteroth, W. & Waddell, S.** (2013). Shocking revelations and saccharin sweetness in the study of *Drosophila* olfactory memory. *Curr Biol* **23**, R752–R763.
- Pham-Delègue, M.H., Bailez, O., Blight, M.M., Masson, C., Picard-Nizou, A.L. & Wadhams, L.J.** (1993). Behavioural discrimination of oilseed rape volatiles by the honeybee *Apis mellifera* L. *Chem Senses* **18**, 483–494.
- Provecho, Y. & Josens, R.** (2009). Olfactory memory established during trophallaxis affects food search behaviour in ants. *J Exp Biol* **212**, 3221–3227.

Q

- Quinn, W.G., Harris, W.A. & Benzer, S.** (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* **71**, 708–712.

R

- Rabin, M.D.** (1988). Experience facilitates olfactory quality discrimination. *Percept Psychophys* **44**, 532–540.
- Rath, L., Giovanni Galizia, C. & Szyszka, P.** (2011). Multiple memory traces after associative learning in the honey bee antennal lobe. *Eur J Neurosci* **34**, 352–360.
- Reinhard, J., Sinclair, M., Srinivasan, M.V. & Claudianos, C.** (2010). Honeybees learn odour mixtures via a selection of key odorants. *PLoS One* **5**, e9110.
- Rescorla, R.A.** (1972). “Configural” conditioning in discrete-trial bar pressing. *J Comp Physiol Psychol* **79**, 307–317.
- Rescorla, R.A.** (1973). Evidence for “unique stimulus” account of configural conditioning. *J Comp Physiol Psychol* **85**, 331–338.
- Rescorla, R. & Wagner, A.** (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In *Classical Conditioning II: Current Research and Theory*, pp. 64–99. Appleton-Century-Crofts.
- Robinson, G.E.** (1987). Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav Ecol Sociobiol* **20**, 329–338.
- Robinson, G.E.** (1992). Regulation of Division of Labor in Insect Societies. *Annu Rev Entomol* **37**, 637–665.
- Roces, F.** (1990). Olfactory conditioning during the recruitment process in a leaf-cutting ant. *Oecologia* **83**, 261–262.
- Roces, F.** (1994). Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundi*. *Insectes Sociaux* **41**, 235–239.
- Rospars, J.-P., Lansky, P., Chaput, M. & Duchamp-Viret, P.** (2008). Competitive and noncompetitive odorant interactions in the early neural coding of odorant mixtures. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **28**, 2659–2666.
- Rössler, W. & Zube, C.** (2011). Dual olfactory pathway in Hymenoptera: evolutionary insights from comparative studies. *Arthropod Struct Dev* **40**, 349–357.
- Roussel, E., Carcaud, J., Combe, M., Giurfa, M. & Sandoz, J.-C.** (2014). Olfactory coding in the honeybee lateral horn. *Curr Biol* **24**, 561–567.
- Roussel, E., Carcaud, J., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M.** (2009). Reappraising social insect behavior through aversive responsiveness and learning. *PLoS ONE* **4**, e4197.

- Rubin, B.D. & Katz, L.C.** (1999). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* **23**, 499–511.
- Rudy, J.W. & Sutherland, R.J.** (1992). Configural and elemental associations and the memory coherence problem. *J Cogn Neurosci* **4**, 208–216.

S

- Sachse, S. & Galizia, C.G.** (2002). Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J Neurophysiol* **87**, 1106–1117.
- Sachse, S., Rappert, A. & Galizia, C.G.** (1999). The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur J Neurosci* **11**, 3970–3982.
- Sakura, M. & Mizunami, M.** (2001). Olfactory learning and memory in the cockroach *Periplaneta americana*. *Zoolog Sci* **18**, 21–28.
- Salzemann, A. & Jaffe, K.** (1991). Polyéthisme et défense de la société chez la fourmi champignoniste *Atta laevigata* (Fr. Smith). *Insectes Sociaux* **38**, 149–159.
- Sandoz, J., Pham-Delègue, M., Renou, M. & Wadhams, L.** (2001). Asymmetrical generalisation between pheromonal and floral odours in appetitive olfactory conditioning of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* **187**, 559–568.
- Sandoz, J.C., Galizia, C.G. & Menzel, R.** (2003). Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neuroscience* **120**, 1137–1148.
- Satoh, T., Masuko, K. & Matsumoto, T.** (1997). Colony genetic structure in the mono- and polygynous sibling species of the ants *Camponotus nawai* and *Camponotus yamaokai*: DNA fingerprint analysis. *Ecol Res* **12**, 71–76.
- Sato, T., Hirono, J., Tonoike, M. & Takebayashi, M.** (1994). Tuning specificities to aliphatic odorants in mouse olfactory receptor neurons and their local distribution. *J Neurophysiol* **72**, 2980–2989.
- Scheiner, R. & Amdam, G.V.** (2009). Impaired tactile learning is related to social role in honeybees. *J Exp Biol* **212**, 994–1002.
- Scheiner, R. & Arnold, G.** (2010). Effects of patriline on gustatory responsiveness and olfactory learning in honey bees. *Apidologie* **41**, 29–37.

- Scheiner, R., Erber, J. & Page, R.E.** (1999). Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* **185**, 1–10.
- Scheiner, R., Kuritz-Kaiser, A., Menzel, R. & Erber, J.** (2005). Sensory responsiveness and the effects of equal subjective rewards on tactile learning and memory of honeybees. *Learn Mem* **12**, 626–635.
- Scheiner, R., Page, R.E. & Erber, J.** (2001a). Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behav Brain Res* **120**, 67–73.
- Scheiner, R., Page, R.E. & Erber, J.** (2001b). The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem* **76**, 138–150.
- Scheiner, R., Page, R.E. & Erber, J.** (2004). Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **35**, 133–142.
- Scheiner, R., Plückhahn, S., Öney, B., Blenau, W. & Erber, J.** (2002). Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behav Brain Res* **136**, 545–553.
- Schilman, P.E.** (2011). Trail-laying behaviour as a function of resource quality in the ant *Camponotus rufipes*. *Psyche J Entomol* **2011**, e139385.
- Schlüens, E.A., Wegener, B.J. & Robson, S.K.A.** (2011). Genetic polyethism and nest building in the weaver ant *Oecophylla smaragdina* (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* **15**, 7–11.
- Schulz, D.J., Pankiw, T., Fondrk, M.K., Robinson, G.E. & Page, R.E.** (2004). Comparisons of juvenile hormone hemolymph and octopamine brain titers in honey bees (Hymenoptera: Apidae) selected for high and low pollen hoarding. *Ann Entomol Soc Am* **97**, 1313–1319.
- Schulz, D.J. & Robinson, G.E.** (1999). Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *J Comp Physiol A* **184**, 481–488.
- Schulz, D.J. & Robinson, G.E.** (2001). Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol A* **187**, 53–61.
- Schulz, D.J., Sullivan, J.P. & Robinson, G.E.** (2002). Juvenile Hormone and Octopamine in the Regulation of Division of Labor in Honey Bee Colonies. *Horm Behav* **42**, 222–231.

- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S. & Heisenberg, M.** (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* **23**, 10495–10502.
- Seid, M.A., Goode, K., Li, C. & Traniello, J.F.A.** (2008). Age- and subcaste-related patterns of serotonergic immunoreactivity in the optic lobes of the ant *Pheidole dentata*. *Dev Neurobiol* **68**, 1325–1333.
- Seid, M.A. & Traniello, J.F.A.** (2005). Age-related changes in biogenic amines in individual brains of the ant *Pheidole dentata*. *Naturwissenschaften* **92**, 198–201.
- Seki, Y., Rybak, J., Wicher, D., Sachse, S. & Hansson, B.S.** (2010). Physiological and morphological characterization of local interneurons in the *Drosophila* antennal lobe. *J Neurophysiol* **104**, 1007–1019.
- Ben-Shahar, Y. & Robinson, G.E.** (2001). Satiation differentially affects performance in a learning assay by nurse and forager honey bees. *J Comp Physiol A* **187**, 891–899.
- Shepard, R.N.** (1987). Toward a universal law of generalization for psychological. *Science* **237**, 1317–1323.
- Shetty, P.S.** (1982). Gustatory preferences of ants (*Camponotus compressus*) for urea and sugars. *Experientia* **38**, 259–260.
- Silbering, A.F. & Galizia, C.G.** (2007). Processing of odor mixtures in the *Drosophila* antennal lobe reveals both global inhibition and glomerulus-specific interactions. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**, 11966–11977.
- Silbering, A.F., Okada, R., Ito, K. & Galizia, C.G.** (2008). Olfactory Information Processing in the *Drosophila* antennal lobe: Anything goes? *J Neurosci* **28**, 13075–13087.
- Skinner, B.F.** (1938). *The behavior of organisms: an experimental analysis*. Appleton-Century, Oxford, England.
- Smith, A.R., Muscedere, M.L., Seid, M.A., Traniello, J.F.A. & Hughes, W.O.H.** (2013). Biogenic amines are associated with worker task but not patriline in the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*. *J Comp Physiol A* **199**, 1117–1127.
- Smith, B.H.** (1996). The role of attention in learning about odorants. *Biol Bull* **191**, 76–83.
- Smith, B.H.** (1998). Analysis of interaction in binary odorant mixtures. *Physiol Behav* **65**, 397–407.
- Smith, B.H. & Menzel, R.** (1989). The use of electromyogram recordings to quantify odourant discrimination in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* **35**, 369–375.

- Spence, W.K.** (1936). The nature of discrimination learning in animals. *Psychol Rev* **43**, 427–449.
- Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B.H. & Laurent, G.** (1997). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* **390**, 70–74.
- Szczuka, A., Korczyńska, J., Wnuk, A., Symonowicz, B., Gonzalez Szwacka, A., Mazurkiewicz, P., Kostowski, W. & Godzińska, E.** (2012). The effects of serotonin, dopamine, octopamine and tyramine on behavior of workers of the ant *Formica polyctena* during dyadic aggression tests. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* **73**, 495–520.
- Szyska, P., Ditzen, M., Galkin, A., Galizia, C.G. & Menzel, R.** (2005). Sparsening and temporal sharpening of olfactory representations in the honeybee mushroom bodies. *J Neurophysiol* **94**, 3303–3313.
- Szyska, P. & Stierle, J.S.** (2014). Mixture Processing and Odor-Object Segregation in Insects. In *Progress in Brain Research*, pp. 63–85. Elsevier.

T

- Takeda, K.** (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *J Insect Physiol* **6**, 168–179.
- Taylor, D.J., Robinson, G.E., Logan, B.J., Lavery, R. & Mercer, A.R.** (1992). Changes in brain amine levels associated with the morphological and behavioural development of the worker honeybee. *J Comp Physiol A* **170**, 715–721.
- Theraulaz, G., Bonabeau, E. & Deneubourg, J.-N.** (1998). Response threshold reinforcements and division of labour in insect societies. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **265**, 327–332.
- Thomas-Danguin, T., Sinding, C., Romagny, S., El Mountassir, F., Atanasova, B., Le Berre, E., Le Bon, A.-M. & Coureaud, G.** (2014). The perception of odor objects in everyday life: a review on the processing of odor mixtures. *Cogn Sci* **5**, 504.
- Traniello, J.F.A.** (1977). Recruitment behavior, orientation, and the organization of foraging in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus* degeer (Hymenoptera: Formicidae). *Behav Ecol Sociobiol* **2**, 61–79.
- Traniello, J.F.A.** (1980). Colony specificity in the trail pheromone of an ant. *Naturwissenschaften* **67**, 361–362.

Références

Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C. & Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* **79**, 35–47.

U

Uchida, N., Takahashi, Y.K., Tanifuji, M. & Mori, K. (2000). Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci* **3**, 1035–1043.

V

Vergoz, V., McQuillan, H.J., Geddes, L.H., Pullar, K., Nicholson, B.J., Paulin, M.G. & Mercer, A.R. (2009). Peripheral modulation of worker bee responses to queen mandibular pheromone. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 20930–20935.

Verhaeghe, J.C. (1982). Food recruitment in *Tetramorium impurum* (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux* **29**, 67–85.

Vosshall, L.B., Amrein, H., Morozov, P.S., Rzhetsky, A. & Axel, R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* **96**, 725–736.

Vosshall, L.B. & Stocker, R.F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci* **30**, 505–533.

Vosshall, L.B., Wong, A.M. & Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* **102**, 147–159.

Vowles, D.M. (1964). Olfactory learning and brain lesions in the wood ant (*Formica rufa*). *J Comp Physiol Psychol* **58**, 105–111.

W

Wagener-Hulme, C., Kuehn, J.C., Schulz, D.J. & Robinson, G.E. (1999). Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol A* **184**, 471–479.

- Wang, H., Zhang, S.-W., Zeng, Z.-J. & Yan, W.-Y.** (2014). Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie* **45**, 618–625.
- Wang, J.W., Wong, A.M., Flores, J., Vosshall, L.B. & Axel, R.** (2003). Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* **112**, 271–282.
- Watkins, R.W., Gurney, J.E. & Cowan, D.P.** (1998). Taste-aversion conditioning of house mice (*Mus domesticus*) using the non-lethal repellent, cinnamamide. *Appl Anim Behav Sci* **57**, 171–177.
- Weidenmüller, A.** (2004). The control of nest climate in bumblebee (*Bombus terrestris*) colonies: interindividual variability and self reinforcement in fanning response. *Behav Ecol* **15**, 120–128.
- Wenseleers, T., Schoeters, E., Billen, J. & Wehner, R.** (1998). Distribution and comparative morphology of the cloacal gland in ants (Hymenoptera : Formicidae). *Int J Insect Morphol Embryol* **27**, 121–128.
- Whitlow, J.W. & Wagner, A.R.** (1972). Negative patterning in classical conditioning: Summation of response tendencies to isolable and configural components. *Psychon Sci* **27**, 299–301.
- Van Wilgenburg, E., Felden, A., Choe, D.-H., Sulc, R., Luo, J., Shea, K.J., Elgar, M.A. & Tsutsui, N.D.** (2012). Learning and discrimination of cuticular hydrocarbons in a social insect. *Biol Lett* **8**, 17–20.
- Van Wilgenburg, E. van, Sulc, R., Shea, K.J. & Tsutsui, N.D.** (2010). Deciphering the chemical basis of nestmate recognition. *J Chem Ecol* **36**, 751–758.
- Whitehouse, M.E.A. & Jaffe, K.** (1996). Ant wars: combat strategies, territory and nest defence in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Anim Behav* **51**, 1207–1217.
- Wilson, D.A. & Stevenson, R.J.** (2003). Olfactory perceptual learning: the critical role of memory in odor discrimination. *Neurosci Biobehav Rev* **27**, 307–328.
- Wilson, R.I. & Laurent, G.** (2005). Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *J Neurosci* **25**, 9069–9079.
- Wnuk, A., Wiater, M. & Godzińska, E.J.** (2011). Effect of past and present behavioural specialization on brain levels of biogenic amines in workers of the red wood ant *Formica polyctena*. *Physiol Entomol* **36**, 54–61.
- Wolpaw, J.R.** (1987). Operant conditioning of primate spinal reflexes: the H-reflex. *J Neurophysiol* **57**, 443–459.

Wyatt, T.D. (2014). *Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signatures*. Cambridge University Press.

X

Xu, F., Liu, N., Kida, I., Rothman, D.L., Hyder, F. & Shepherd, G.M. (2003). Odor maps of aldehydes and esters revealed by functional MRI in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 11029–11034.

Y

Yamagata, N., Fujiwara-Tsujii, N., Yamaoka, R. & Mizunami, M. (2005). Pheromone communication and the mushroom body of the ant, *Camponotus obscuripes* (Hymenoptera: Formicidae). *Naturwissenschaften* **92**, 532–536.

Yamagata, N., Nishino, H. & Mizunami, M. (2006). Pheromone-sensitive glomeruli in the primary olfactory centre of ants. *Proc Biol Sci* **273**, 2219–2225.

Yamagata, N., Nishino, H. & Mizunami, M. (2007). Neural pathways for the processing of alarm pheromone in the ant brain. *J Comp Neurol* **505**, 424–442.

Yamagata, N., Schmuker, M., Szyszka, P., Mizunami, M. & Menzel, R. (2009). Differential odor processing in two olfactory pathways in the honeybee. *Front Syst Neurosci*; DOI: 10.3389/neuro.06.016.2009.

Yilmaz, A., Aksoy, V., Camlitepe, Y. & Giurfa, M. (2014). Eye structure, activity rhythms, and visually-driven behavior are tuned to visual niche in ants. *Front Behav Neurosci* **8**, 205.

Yokoi, M., Mori, K. & Nakanishi, S. (1995). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 3371–3375.

Youngentob, S.L., Johnson, B.A., Leon, M., Sheehe, P.R. & Kent, P.F. (2006). Predicting odorant quality perceptions from multidimensional scaling of olfactory bulb glomerular activity patterns. *Behav Neurosci* **120**, 1337–1345.

Yu, D., Ponomarev, A. & Davis, R.L. (2004). Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning; memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron* **42**, 437–449.

Z

Zhao, H., Ivic, L., Otaki, J.M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K. & Firestein, S. (1998). Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* **279**, 237–242.

Zhukovskaya, M.I. (2012). Modulation by octopamine of olfactory responses to nonpheromone odorants in the cockroach, *Periplaneta americana* L. *Chem Senses* **37**, 421–429.

Zube, C., Kleineidam, C.J., Kirschner, S., Neef, J. & Rössler, W. (2008). Organization of the olfactory pathway and odor processing in the antennal lobe of the ant *Camponotus floridanus*. *J Comp Neurol* **506**, 425–441.

Zube, C. & Rössler, W. (2008). Caste- and sex-specific adaptations within the olfactory pathway in the brain of the ant *Camponotus floridanus*. *Arthropod Struct Dev* **37**, 469–479.

van Zweden, J.S. & d’Ettorre, P. (2010). *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*, pp. 222–243. Cambridge University Press.

AUTHOR: Margot Perez

TITLE: Division of labour, olfactory learning and perception in the ant *Camponotus aethiops*

ABSTRACT

Ants live in complex societies where different individuals are specialized in particular tasks (e.g., reproduction, brood care, foraging or nest defence). In their natural environment, the majority of ant species rely on olfactory cues. The present work aimed at understanding division of labour, olfactory learning and perception in the ant *Camponotus aethiops*. This species forages partly on extra-floral nectaries, therefore uncovering the mechanisms underlying olfactory learning and perception of environmental odours, such as floral volatiles, is biologically relevant. Here we reveal interindividual variability in sucrose responsiveness among reproductive and behavioural castes, arguing in favour of models positing that division of labour emerges from differences in sensitivity to task-related stimuli. Sucrose responsiveness was also shown to mediate olfactory appetitive learning success: the more sensitive to sucrose is an ant, the better it learns the appetitive association. Accordingly, foragers, more sensitive to sucrose than nurses, learned better the odour-sucrose association. We show that odour's chemical dimensions (i.e. carbon-chain length and functional group) and olfactory experience play a significant role in olfactory perception in this ant species. Perceptual similarity between odours belonging to the same functional group (aldehyde) was inversely related to the difference in carbon-chain length between odours, and can be changed by the conditioning procedure. Indeed, olfactory discrimination was enhanced after differential learning. Finally, we demonstrated that binary mixture perception relies on the combination of functional group and carbon-chain length, with generally a larger salience for alcohol over aldehydes and of long carbon-chain length over shorter ones. Our study contributes to a better understanding of division of labour, olfactory perception and olfactory learning in ants.

Key words: division of labour; appetitive learning; olfactory perception; odour mixture; experience; *Camponotus aethiops*.

AUTHOR: Margot Perez

TITRE: Division du travail, apprentissage et perception des odeurs chez la fourmi
Camponotus aethiops

RESUME

Les fourmis forment des sociétés complexes où les individus sont spécialisés dans des tâches spécifiques (e.g., reproduction, soin au couvain, fourragement) et leur comportement naturel repose principalement sur l'olfaction. L'objet de ce travail était d'améliorer nos connaissances sur la division du travail, l'apprentissage et la mémoire olfactifs chez la fourmi *Camponotus aethiops*, qui fourrage en partie des nectars extra-floraux. Nous avons montré que la sensibilité au sucre différait entre les castes reproductrice et ouvrières, illustrant le modèle des seuils de réponse, qui postule que la division du travail émerge des différences dans la sensibilité à des stimuli biologiquement pertinents pour la réalisation des tâches. La sensibilité au sucre sous-tend les performances d'apprentissage olfactif appétitif : plus la fourmi est sensible au sucre, mieux elle apprend l'association appétitive. Ainsi, les fourrageuses, plus sensibles au sucre que les nourrices, apprenaient mieux l'association odeur-sucre. Les dimensions chimiques des odeurs (e.g. longueur de chaîne carbonée, groupe fonctionnel) et l'expérience olfactive jouent un rôle central dans la perception des odeurs. La similarité perceptuelle entre des odeurs d'un même groupe fonctionnel (aldéhyde) était inversement proportionnelle à la différence de chaîne carbonée entre les odeurs. De plus, la discrimination olfactive était améliorée par un apprentissage différentiel. Enfin, nous avons montré que la perception des mélanges d'odeurs dépendait de la combinaison du groupe fonctionnel et de la longueur de chaîne carbonée, avec généralement une plus grande saillance des alcools sur les aldéhydes et des chaînes longues sur les courtes. Notre étude apporte une meilleure compréhension de la division du travail, la perception et l'apprentissage olfactifs chez la fourmi.

DISCIPLINE : Ethologie

MOTS-CLEFS : division du travail; apprentissage appétitif; perception olfactive; mélange d'odeurs; expérience; *Camponotus aethiops*.

Laboratoire d'éthologie expérimentale et comparée (LEEC)
99 avenue JB Clément
93430 Villetaneuse