

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE – PARIS VI

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris VI

Discipline : Ecologie

**Défenses immunitaires et division du travail
chez les fourmis**

par

Aurélie BOCHER

Soutenue le 23 octobre 2007 devant le jury composé de :

Robert BARBAULT	Professeur.....Président (Université Paris VI)
Suzanne FOITZIK	Professeur.....Rapporteur (Ludwig-Maximilians-Universität München)
Alain LENOIR	Professeur.....Rapporteur (Université de Tours)
Yannick MORET	Chargé de recherches CNRS.....Examineur (Université de Dijon)
Claudie DOUMS	Maître de conférence EPHE.....Directeur de thèse (Université Paris VI)
Claire TIRARD	Maître de conférence.....Directeur de thèse (Université Paris VI)

Laboratoire de Parasitologie Evolutive
CNRS UMR 7103, Université Paris VI, Ecole Normale Supérieure
Ecole Doctorale Diversité du vivant

Résumé

Chez les insectes sociaux, les défenses immunitaires sont importantes à la fois pour la survie individuelle et pour la protection de la colonie contre les infections parasitaires. Nous avons étudié comment les défenses immunitaires, qui sont un trait coûteux, étaient modulées par la division du travail concernant la reproduction ou les autres tâches. En effet, les différentes fonctions assurées par les individus au sein de la colonie peuvent être associées à des contraintes sélectives distinctes et donc faire varier l'investissement immunitaire. Réciproquement, considérer les défenses immunitaires comme un trait d'histoire de vie peut aider à comprendre certains aspects de l'évolution sociale. Les fourmis offrent des modèles intéressants pour ces problématiques. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact des conflits reproducteurs dans une espèce de fourmi sans reine, *Diacamma sp.* Nilgiri. Un taux plus faible de travail et une immunosuppression ont été observés dans les groupes affectés par les conflits, ce qui suggère un coût des conflits reproducteurs. Dans un deuxième temps, nous avons examiné les niveaux de phénoloxydase (PO) et prophénoloxydase (PPO), deux enzymes importantes du système immunitaire des insectes, chez les ouvrières de la fourmi *Cataglyphis velox*. Nous avons trouvé que les fourrageuses présentaient des niveaux plus élevés de PO que les ouvrières internes. Ceci semble indiquer une élévation du niveau de PO chez les fourrageuses en lien avec le risque élevé de blessures et d'infection à l'extérieur du nid. Enfin, nous avons fait l'hypothèse que les ouvrières inactives, fréquemment observées dans les colonies, pourraient investir plus de ressources dans les défenses immunitaires. Nous avons conduit une étude comportementale chez *Cataglyphis velox* associée à des mesures de défenses immunitaires. Nous n'avons pas mis en évidence de lien entre l'inactivité des ouvrières et leurs défenses immunitaires mais d'autres paramètres immunitaires pourraient être analysés. L'ensemble de ces travaux suggère que la division du travail pourrait influencer la variation intra-coloniale dans l'immunité et souligne l'importance de prendre en compte les défenses immunitaires dans l'étude des insectes sociaux.

Mots-clés : immunologie évolutive, variation immunitaire, conflits reproducteurs, immunosuppression, plasticité phénotypique, risque d'infection, exposition aux pathogènes, ouvrières inactives, *Diacamma*, *Cataglyphis velox*, infection bactérienne, phénoloxydase, prophénoloxydase

Abstract

Immune defence is a fundamental trait determining fitness in social insects, both by increasing individual survival and by limiting contamination at colony level. We investigated how individual variation in immune defence, which is a costly trait, is related to division of labour concerning reproduction or sterile tasks. Indeed, the different worker functions within the colony may be associated to distinct selection pressures and thus induce a variation in immune defence. Reciprocally, including immune defence as a life-history trait can help to understand some aspects of social evolution. Ants offer interesting models to address these questions. Firstly, we studied the effects of reproductive conflicts on labour and immune defence in a queenless ant, *Diacamma sp.* from Nilgiri. The groups affected by conflicts showed a lower rate of labour and an immunosuppression, suggesting a cost of reproductive conflicts. Secondly, we investigated the levels of phenoloxidase (PO) and prophenoloxidase (PPO), two major enzymes of the insect immune system, in workers of the ant *Cataglyphis velox*. We found a higher PO activity in foragers than in intra-nidal workers, which could result from an adaptive up-regulation of PO in foragers in relation to the high risk of infection and wounding outside the nest. Finally, we hypothesized that inactive workers, often observed in social insect colonies, may invest more resources in immune defence. We conducted a behavioural and immunological study in *Cataglyphis velox* to analyse the relation between inactivity and immune defence. Our hypothesis was not supported but could be further studied by measuring other immune parameters. This work suggests that division of labour may influence the intra-colonial immune variation and highlights the importance of considering immune defence for the study of social insects.

Keywords : ecological immunology, immune variation, reproductive conflicts, immunosuppression, phenotypic plasticity, infection risk, pathogen exposure, inactive workers, *Diacamma*, *Cataglyphis velox*, bacterial infection, phenoloxidase, prophenoloxidase

Remerciements

Je tiens à remercier Robert Barbault, Suzanne Foitzik, Alain Lenoir et Yannick Moret d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'adresse d'abord un immense merci à mes directrices de thèse, Claire Tirard et Claudie Doums, sans qui rien de ce travail n'aurait été possible. Leur compétence et leur gentillesse m'ont été très précieuses tout au long de cette thèse.

Merci à Claire pour son aide concrète dans les expériences, son soin et sa rigueur dans les manipulations et la relecture des articles. Sa présence rassurante et discrète, son indulgence m'ont apporté un grand soutien. J'ai été marquée par sa profonde bienveillance envers tous, et le respect et la finesse qu'elle montre dans les relations humaines.

Merci à Claudie pour sa disponibilité, son énergie, sa passion pour la recherche. Ce travail doit beaucoup à sa compétence dans les analyses statistiques et l'écriture des articles. Je lui suis reconnaissante aussi d'avoir su m'encadrer avec exigence et clairvoyance, tout en étant patiente et compréhensive.

Je remercie aussi mes collaborateurs :

- Laurence Millot, qui a participé aux manipulations de microbiologie
- Claudy Haussy pour ses précieux conseils techniques et son aide pour les dosages spectrophotométriques
- les étudiants qui ont réalisé des observations comportementales, et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler : François Rineau, Jean-Baptiste Caillau, Camille Ruel, Maud Le Boulh, Virginie Moirez et Joshka Kaufmann.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé aux missions de terrain :

- Sébastien Baratte, qui m'a accompagnée pour récolter les *Diacamma* et m'a fait découvrir l'Inde du Sud, ses masalas dosas et autres merveilles
- Thibaud Monnin, Alain Lenoir, Raphaël Boulay, Xim Cerda, Danival Souza et Vincent Leucat qui m'ont aidée à creuser les nids de *Cataglyphis*, en des endroits plus ou moins agréables et des sols plus ou moins caillouteux...

Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu d'intéressants échanges scientifiques durant cette thèse :

- les membres de mon comité de thèse : Virginie Cuvillier-Hot, Alain Lenoir et Yannick Moret
- les membres du laboratoire de Parasitologie, en particulier Oliver Kaltz, Thibault Nidelet et Anders Moller
- les personnes de «l'équipe fourmi », de nom officiel « Evolution des sociétés d'insectes », en particulier Christian Peeters et Thibaud Monnin, qui se sont toujours montrés prêts à m'aider et à répondre à mes questions

Je remercie tout spécialement mes compères de bureau, Hélène Magalon, Mathieu Molet et Blandine Chéron pour leur présence et leur soutien dans les moments difficiles, et aussi leur aide concrète (Mathieu, qu'est ce que je ferais sans toi !). La joie que j'ai trouvée durant ces années de thèse doit beaucoup à leur bonne humeur et leur amitié.

Merci aussi à Simon Fellous, pour sa bienveillante présence au laboratoire au début de ma thèse, son écoute et ses encouragements jusqu'à la fin... Il m'a aussi gentiment prêté ses talents de photographe, les photos de *Cataglyphis velox* qui sont dans ce manuscrit portent son copyright !

Merci enfin à tous les membres des Laboratoires d'Ecologie et de Parasitologie Evolutive, en particulier Nathalie Guillory, Nicolas Loeuille, Clarisse Coquemont, Jean-Marc Rossi et Pierre Federici, pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

Table des matières	page
Introduction	9
1. Défenses immunitaires et biologie évolutive.....	10
1.1 L'écologie évolutive, une approche éco-évolutive des défenses immunitaires.....	10
1.2 Les insectes : des modèles d'étude intéressants.....	11
2. Les défenses immunitaires chez les insectes sociaux.....	16
2.1. L'importance du parasitisme chez les insectes sociaux.....	16
2.2. Défenses immunitaires et organisation sociale.....	17
3. Défenses immunitaires et division du travail.....	19
3.1. Défenses immunitaires et division du travail reproducteur.....	19
3.2. Défenses immunitaires et division du travail entre les ouvrières.....	22
3.3. Modèles biologiques utilisés.....	22
 Partie I – Impact des conflits reproducteurs sur le travail et les défenses immunitaires chez la fourmi sans reine <i>Diacamma sp.</i> de Nilgiri	 23
1. Problématique.....	23
2. Modèle biologique et méthodes employées.....	23
3. Principaux résultats.....	25
 Partie II – Plasticité phénotypique dans les défenses immunitaires en lien avec le fourragement chez la fourmi <i>Cataglyphis velox</i>	 27
1. Problématique.....	27
2. Modèle biologique et méthodes employées.....	28
3. Principaux résultats.....	30
 Partie III – Comportement individuel et variation immunitaire dans les colonies de <i>Cataglyphis velox</i>	 32
1. Problématique.....	32
2. Modèle biologique et méthodes employées.....	34
3. Principaux résultats.....	35
 Synthèse et Perspectives	 37
1. Mesures de l'immunocompétence : interprétation et validation.....	38
2. Origine des variations immunitaires : coûts et facteurs proximaux.....	40
3. Variations immunitaires en lien avec l'environnement.....	43
3.1. A l'échelle individuelle : intérêt de la plasticité phénotypique.....	45
3.2. A l'échelle de la population : différents mécanismes impliqués.....	45
4. Les défenses immunitaires, une tâche coloniale partagée ?.....	47
4.1. Réalisation des compromis à l'échelle de la colonie.....	47
4.2. Intérêt d'une variabilité intra-coloniale ?.....	47
 Bibliographie	 49
 Articles	
Article 1 : Bocher A., Doums C., Millot L. & Tirard C. Impact of reproductive conflicts on labour and immune defense in the queenless ant <i>Diacamma sp.</i> from Nilgiri. Evolution (accepted with minor revisions)	
Article 2 : Bocher A., Tirard C. & Doums, C. Phenotypic plasticity of immune defence in relation to foraging activity in the ant <i>Cataglyphis velox</i>. Journal of Evolutionary Biology (in press)	
Article 3 : Bocher A., Doums C., Haussy C. & Tirard C. Individual behaviour and immunological variation in colonies of <i>Cataglyphis velox</i>. In preparation	

Introduction

Après des décennies d'études essentiellement fonctionnelles, les défenses immunitaires sont, depuis les années 1970, également abordées sous l'angle de l'immunologie évolutive. Cette approche vise à « comprendre les causes et conséquences de la variation dans la fonction immunitaire, dans un contexte écologique et évolutif » (Schmid-Hempel, 2003). La vie en société, qui implique une densité élevée des individus, est considérée comme un facteur augmentant l'impact potentiel des parasites. Les liens entre défenses immunitaires et socialité ont fait l'objet d'études chez les Vertébrés, mais très peu chez les insectes où la vie sociale existe également dans de nombreuses espèces.

Une caractéristique majeure des sociétés d'insectes est l'existence d'une division du travail, à la fois en ce qui concerne la reproduction et les autres tâches. Ce phénomène est particulièrement poussé chez les fourmis qui montrent une impressionnante diversité des modes d'organisation sociale. Les individus présentent des schémas d'histoire de vie très variés, liés à des pressions de sélection différentes pouvant se répercuter sur les défenses immunitaires. Réciproquement, la nécessité de développer des défenses peut avoir modulé les caractéristiques de la division du travail propres à chaque espèce.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux liens entre les défenses immunitaires et la division du travail : quel est l'impact, à différentes échelles de temps, de la division du travail sur les défenses immunitaires ? Comment les défenses immunitaires peuvent-elles s'intégrer dans la division du travail ? En introduction, nous rappellerons tout d'abord les principes de l'évolution des défenses immunitaires mis en évidence chez les vertébrés et les insectes. Puis nous présenterons l'intérêt des modèles insectes sociaux pour les problématiques de l'immunologie évolutive. Nous nous interrogerons enfin sur la manière dont l'immunocompétence peut être modulée par la division du travail.

1. Défenses immunitaires et biologie évolutive

1.1. L'écologie évolutive, une approche éco-évolutive des défenses immunitaires

L'impact élevé du parasitisme sur les populations animales est largement reconnu (Moller et al., 1993; Lochmiller, 1996). L'intérêt croissant pour les relations hôtes-parasites a révélé que les pressions parasitaires qui s'exercent sur les populations influencent l'évolution de leurs caractères, aussi bien physiologiques que phénologiques ou comportementaux (Schmid-Hempel, 1998). Les défenses immunitaires sont l'une des lignes essentielles de défense vis à vis des parasites et apparaissent alors comme l'un des facteurs déterminants de la qualité des individus et de leur valeur sélective (Lochmiller & Deerenberg, 2000).

Les défenses immunitaires constituent un ensemble de traits variables à l'échelle individuelle. L'immunologie évolutive (en anglais « ecological immunology ») vise d'abord à comprendre quels facteurs influent sur ces variations. Les travaux dans ce domaine ont mis en évidence que le niveau de défenses immunitaires était affecté, au niveau proximal, par les paramètres individuels tels que la taille, le statut nutritionnel ou le sexe (Zuk & Stoehr, 2002). Au niveau ultime, l'investissement immunitaire est lié à la pression parasitaire s'exerçant sur les populations (Moller et al., 2001). Celle-ci dépend, d'une part, de la présence de parasites et pathogènes dans le milieu de vie (Schmid-Hempel, 2003), et d'autre part des paramètres concernant les congénères, tels que la densité (par ex. Barnes & Siva-Jothy, 2000; Wilson et al., 2002).

L'immunologie évolutive s'intéresse également aux processus micro-évolutifs expliquant la genèse et le maintien des variations immunitaires. Les facteurs environnementaux influent sur les défenses immunitaires en modifiant l'impact potentiel des parasites et donc l'intérêt de développer une résistance. Cependant, le maintien d'une variabilité dans la résistance aux parasites suggère que le développement de l'immunité est limité. De même, l'observation classique d'une immuno-suppression dans le cas de restrictions nutritionnelles montre que l'investissement immunitaire est soumis à des contraintes (Sheldon & Verhulst, 1996). D'après la théorie des traits d'histoire de vie, les ressources de l'organisme sont limitées et l'investissement dans un trait associé à la valeur sélective se fait au détriment des autres traits. Ces traits évoluent alors de manière conjointe, la sélection favorisant les stratégies d'allocation des ressources qui maximisent la valeur sélective (Roff, 1992; Stearns, 1992).

D'abondants travaux chez les vertébrés ont mis en évidence que les principes gouvernant l'évolution des traits d'histoire de vie s'appliquent aux défenses immunitaires, démontrant ainsi leur caractère coûteux (Sheldon & Verhulst, 1996; Zuk & Stoehr, 2002). Des études chez les oiseaux et les mammifères ont exploré l'existence de « trade-offs », ou compromis, entre les défenses immunitaires et d'autres traits (en particulier la reproduction: Festa-Bianchet, 1989; Deerenberg et al., 1997; Saino et al., 1997). Les pressions de sélection exercées sur ces traits peuvent se répercuter sur les défenses immunitaires, qui sont donc modulées par les schémas d'histoire de vie (par ex. Koella & Boete, 2002).

Réciproquement, la nécessité de résister aux parasites influence les histoires de vie. La prise en compte des défenses immunitaires comme un trait d'histoire de vie a ainsi permis de comprendre certains aspects de la sélection sexuelle chez les oiseaux. L'hypothèse du handicap (« immunocompetence handicap »), appuyée par de nombreux travaux, postule que les caractères sexuels secondaires des mâles, objet de choix par les femelles, constituent un signal honnête de bonne qualité, seuls les mâles de bonne condition corporelle pouvant investir simultanément dans les défenses immunitaires et ces caractères coûteux (Hamilton & Zuk, 1982; Folstad & Karter, 1992; Saino & Moller, 1996). Les pressions parasitaires peuvent donc influencer l'évolution de traits qui ne leur semblent pas directement reliés.

2. Les insectes : des modèles d'étude intéressants

Le domaine de l'immunologie évolutive s'est ensuite considérablement développé en bénéficiant des intérêts des modèles insectes. En plus d'être facile à manipuler, les insectes offrent des possibilités de mesures simples de l'immunocompétence (Encadré 2) car ils possèdent essentiellement une immunité innée (Encadré 1, Figure 1). Bien que le système immunitaire des insectes fonctionne de manière largement différente de celui des vertébrés, les principes de l'immunologie évolutive découverts chez les vertébrés sont vérifiés chez les insectes. La mise en évidence de trade-offs variés chez les insectes indique un coût physiologique de leurs défenses immunitaires. D'une part, une immuno-suppression est souvent observée lors d'une restriction nutritionnelle (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1998; Moret & Schmid-Hempel, 2000; Siva-Jothy & Thompson, 2002) ou d'une augmentation de la demande énergétique associée à diverses fonctions, comme l'activité musculaire ou reproductive (Siva-Jothy et al., 1998; McKean & Nunnery, 2001; Rolff & Siva-Jothy, 2002). Ceci indique un coût de maintenance du système immunitaire. D'autre part, une stimulation antigénique peut entraîner une diminution de la survie ou du succès reproducteur, ce qui montre le coût de l'activation du système immunitaire (Siva-Jothy et al., 2001; Ahmed et al., 2002; Armitage et al., 2003).

Le système immunitaire des insectes est la dernière ligne de défense contre les parasites et pathogènes, lorsque la barrière cuticulaire est franchie. Il se base sur trois processus fondamentaux (Figure 1) dans lesquels des composants cellulaires et humoraux interagissent pour neutraliser les parasites et pathogènes (Hoffmann, 1995; Siva-Jothy et al., 2005).

1) Des hémocytes peuvent réaliser la **phagocytose** de petits éléments étrangers tels que des bactéries, de manière semblable à ce qui est connu chez les vertébrés. En revanche les deux autres mécanismes de défense n'existent pas chez les vertébrés.

2) L'**encapsulation** correspond à l'isolement du pathogène dans une capsule mélanique, qui est acellulaire dans le cas de petits pathogènes (bactéries, champignons), ou qui résulte de l'agrégation d'hémocytes dans le cas de gros corps étrangers (nématodes, œufs de parasitoïdes). La mélanine étant imperméable et toxique, l'élément enfermé est asphyxié et empoisonné. La polymérisation de mélanine à partir de quinones est réalisée par une cascade enzymatique dont l'élément central est la phénoloxydase. Ce système est en partie constitutif, et est activé lors d'une infection.

3) La reconnaissance d'un pathogène grâce à des éléments antigéniques (caractéristiques des différentes classes de micro-organismes) peut déclencher la **production par le corps gras de peptides anti-microbiens**. Ceux-ci sont libérés dans l'hémolymphe où ils tuent les parasites, par exemple en changeant la perméabilité membranaire. Ce processus est donc entièrement inductible, à la différence de la phagocytose et l'encapsulation. Lors d'une infection, la phagocytose et l'encapsulation interviennent dès les premières minutes tandis que les peptides anti-microbiens ne sont détectés qu'au bout de plusieurs heures.

La réponse immunitaire des insectes peut être spécifique : les mécanismes de reconnaissance permettent une discrimination entre différents types de pathogènes, engendrant une réponse immunitaire différente selon le pathogène présenté (Schmid-Hempel & Ebert, 2003).

Bien que les insectes ne possèdent pas d'anticorps (qui sont la base de l'immunité acquise des vertébrés), l'existence d'une immunité acquise chez les insectes a été récemment démontrée. En effet, des processus d'épissage alternatif dans les gènes codant les molécules de reconnaissance donnent lieu à un répertoire considérable de motifs. La création d'un répertoire différent en fonction du pathogène présenté génère une réponse ultérieure plus efficace et permet donc une mémoire immunitaire.

Encadré 1 : Le système immunitaire des Insectes

Pathogènes de grande taille

Champignons, œufs de parasitoïdes, macroparasites (nématodes...)

Pathogènes de petite taille

Bactéries, virus, protozoaires

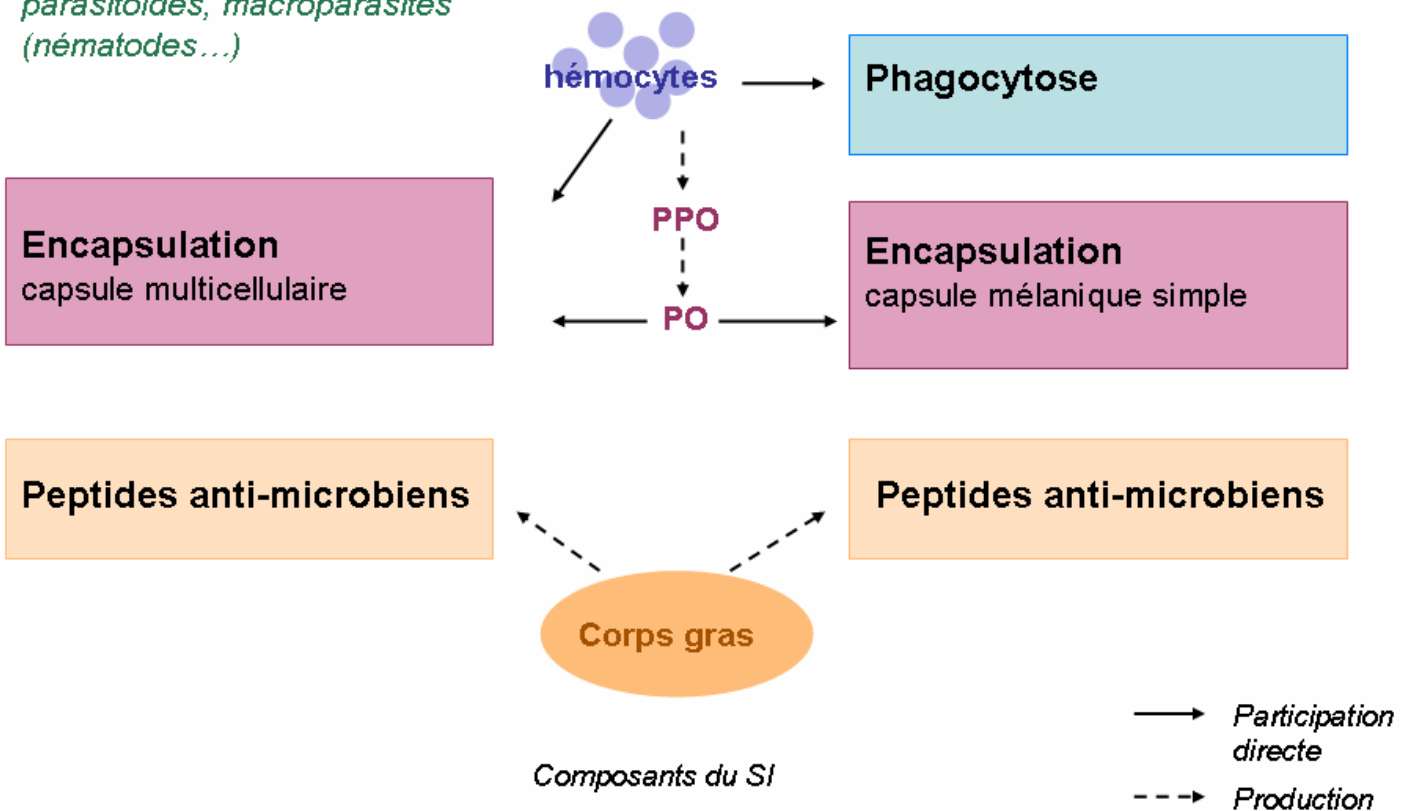


Figure 1 : Principaux mécanismes et acteurs du système immunitaire des insectes. Les différents processus interagissent lors d'une réponse immunitaire, notamment grâce aux hémocytes qui sont des acteurs centraux du système immunitaire. Ils produisent l'enzyme précurseur de la phénoloxydase, sont directement impliqués dans la phagocytose et l'encapsulation, et interviennent aussi dans la reconnaissance des pathogènes et l'activation de l'ensemble du système immunitaire.

Les défenses immunitaires semblent également avoir un coût évolutif. En effet, une forte pression parasitaire peut sélectionner les génotypes investissant de manière importante dans les défenses immunitaires car l'héritabilité des paramètres immunitaires est élevée (Fellowes et al., 1998; Cotter & Wilson, 2002; Schwarzenbach & Ward, 2006). L'existence d'une corrélation génétique négative entre les défenses immunitaires et d'autres traits a été démontrée dans plusieurs espèces (par ex. Cotter et al., 2004) ce qui suggère que l'évolution des défenses immunitaires peut impliquer un coût sur les autres traits. La rapidité du cycle de vie des insectes autorise des programmes de sélection artificielle. Par exemple, des études chez les moustiques ou les drosophiles ont montré que les lignées sélectionnées pour une grande résistance à des parasites présentaient des valeurs réduites dans des traits liés à la reproduction ou à la survie (Siva-Jothy et al., 2005). Les résultats de ces sélections artificielles sont une confirmation expérimentale de l'existence d'un coût évolutif des défenses immunitaires.

Les travaux chez les insectes ont également permis d'élargir la compréhension de l'évolution des défenses immunitaires. Par exemple, l'observation chez les vertébrés d'une meilleure fonction immunitaire des femelles par rapport aux mâles a été reliée à l'effet immunosuppresseur de la testostérone, l'hormone sexuelle mâle (Zuk & Stoehr, 2002). Cependant, les mêmes relations ont été observées chez les insectes malgré l'absence de testostérone (Nigam et al., 1997; Kurtz et al., 2000; Vainio et al., 2004). Ainsi, d'autres hormones sont probablement impliquées chez les insectes, ce qui suggère un mécanisme évolutif plus général. Entre les mâles et les femelles, les pressions de sélection sont différentes car le succès reproducteur des mâles dépend du nombre d'accouplements alors que pour les femelles c'est le nombre de jeunes produits qui est limitant. Le compromis entre défenses immunitaires et reproduction se traduit alors différemment. Ceci est particulièrement marqué chez les insectes où la durée de vie des mâles est courte par rapport à celle des femelles. En effet, l'intérêt d'investir dans les défenses dépend de l'intensité de la sélection pour la survie : pour les mâles un investissement massif dans la reproduction est favorisé, alors que les femelles ont intérêt à investir aussi dans les défenses immunitaires (Adamo et al., 2001; Rolff, 2001).

Cet exemple montre que l'élargissement du cadre taxonomique dans lequel les problématiques évolutives sont étudiées permet d'enrichir ou de revoir les concepts élaborés à partir d'un nombre restreint de modèles. Plus récemment, la découverte chez les insectes d'une immunité acquise conduit à redéfinir cette notion, jusqu'ici discutée uniquement chez les vertébrés (Kurtz & Armitage, 2006). De manière similaire, le lien entre vie sociale et défenses immunitaires a été étudié surtout chez les vertébrés (Nunn et al., 2000; Moller et al., 2001), et la compréhension de l'évolution des défenses immunitaires dans le cadre de la socialité peut bénéficier d'études chez les insectes sociaux.

Lorsque l'on veut évaluer une fonction physiologique, deux approches sont possibles : mesurer directement le résultat de cette fonction (par exemple si l'on s'intéresse à la reproduction, déterminer le nombre de jeunes produits), ou doser une molécule dont la quantité est corrélée avec la fonction étudiée (par exemple, pour la reproduction des insectes, la concentration de l'hémolymphe en vitellogénine). En ce qui concerne la fonction immunitaire, on appelle immunocompétence la capacité à monter une réponse immunitaire efficace. Pour la mesurer, les deux approches expliquées ci-dessus sont employées, et ce de multiples façons.

D'une part, on peut utiliser le **dosage d'un composant du système immunitaire**. Chez les insectes, les mesures les plus couramment employées sont la concentration d'hémocytes ou l'activité phénoloxydase dans l'hémolymphe ou encore l'activité lytique de l'hémolymphe, qui évalue la quantité de peptides anti-microbiens produits suite à une stimulation antigénique. L'avantage de ces méthodes est qu'elles ne sont pas, ou peu, relatives à un pathogène précis.

D'autre part, on peut réaliser un **test de résistance à un pathogène**, qui est le plus souvent une bactérie (par exemple *Serratia marsescens*) ou un champignon (par exemple *Metarhizium anisopliae*). Suite à une inoculation, on mesure alors la survie des individus, ou l'élimination du pathogène. Bien que dépendant fortement du pathogène choisi, ce type de test se base sur une réponse immunitaire effective, impliquant simultanément les différents composants du système immunitaire et leur interaction.

La mesure utilisée, résistance à un pathogène donné ou dosage d'un élément du système immunitaire, est choisie en fonction de la problématique : si l'on souhaite évaluer l'investissement dans la fonction immunitaire, ou l'allocation des ressources entre les différents composants du système immunitaire, un ou plusieurs dosages pourront être réalisés. La mesure de la résistance à un pathogène sera en revanche plus adaptée si on cherche par exemple à évaluer l'efficacité de la réponse immunitaire à l'échelle de la colonie, ou encore l'effet d'une interaction entre les individus. Enfin, le choix de la méthode peut aussi être limité par le modèle biologique. Ainsi, certaines mesures nécessitant un volume minimum d'hémolymphe sont difficiles à réaliser sur des organismes de très petite taille.

Encadré 2 : Mesure des défenses immunitaires chez les insectes

2. Les défenses immunitaires chez les insectes sociaux

D'un point de vue fonctionnel, le système immunitaire des insectes sociaux est semblable à celui des autres insectes. Mais les défenses immunitaires ont des implications évolutives spécifiques liées à la socialité.

2.1. Importance du parasitisme chez les insectes sociaux

Il est souvent considéré que la forte densité des individus liée à la vie en groupe implique des risques de transmission parasitaire élevés et donc un fort impact potentiel des parasites (Moller et al., 1993; Nunn et al., 2000). Ce phénomène pourrait être accentué chez les insectes sociaux du fait de la proximité génétique liée à l'apparentement élevé au sein des colonies. D'ailleurs, les comportements réduisant les risques de parasitisme (Moller et al., 1993; Loehle, 1995), connus dans toutes les espèces sociales, sont particulièrement développés chez les insectes sociaux. Outre les processus de nettoyage réciproque, qui ont leur équivalent dans les sociétés de primates, les insectes sociaux ont des comportements collectifs limitant les infections parasitaires, tels que l'élimination sélective du couvain parasité (Schmid-Hempel, 1998). Les déchets sont également évacués de telle façon que les micro-organismes qui s'y développent ne contaminent pas le nid (Hart & Ratnieks, 2001). De plus, des sécrétions antibiotiques ont été mises en évidence dans de nombreux groupes taxonomiques (Schmid-Hempel, 1998; Rosengaus et al., 2000; Hughes et al., 2002; Poulsen et al., 2002; Turillazi et al., 2004) et l'utilisation de substances végétales aux propriétés antimicrobiennes a été montrée chez les fourmis (Christe et al., 2003). La pression parasitaire à laquelle sont soumis les insectes sociaux a donc conduit à des adaptations comportementales et biochimiques qui limitent l'impact des parasites.

Un nombre croissant d'études montre que la pression parasitaire peut avoir modulé de nombreux autres traits de l'organisation sociale des insectes (Schmid-Hempel, 1998). Ainsi l'impact des parasites pourrait expliquer en partie l'évolution de la polyandrie, qui est un comportement coûteux puisqu'il augmente les risques de prédation et de transmission de maladies sexuellement transmissibles (Arnqvist & Nilsson, 2000). Une des hypothèses avancées pour expliquer les taux élevés de polyandrie de certaines espèces est que cela augmenterait la résistance aux parasites grâce à une plus grande diversité génétique des ouvrières (Sherman et al., 1988; Baer & Schmid-Hempel, 1999).

Les liens entre organisation sociale et résistance aux parasites dans les colonies d'insectes sociaux ont été étudiés sous un angle essentiellement comportemental. Mais ces problématiques peuvent également être abordées du point de vue physiologique. Les

défenses immunitaires sont en effet, avec les adaptations comportementales, le deuxième volet important de la résistance au parasitisme chez les insectes sociaux.

2.2. Défenses immunitaires et organisation sociale

L'immunité est l'un des principaux mécanismes physiologiques contrôlant la survie (Lochmiller & Deerenberg, 2000). Or, la survie a été longtemps une composante peu étudiée de la valeur sélective, en partie car elle est difficile à quantifier sur le terrain. Pour les ouvrières d'insectes sociaux, qui ne se reproduisent généralement pas, la valeur sélective dépend de leur contribution à la productivité de la colonie et de leur survie. L'immunité, qui influence ces deux paramètres (Doums et al., 2002), est donc un trait d'histoire de vie important chez les insectes sociaux.

Des travaux récents d'immunologie évolutive ont utilisé comme modèle biologique les insectes sociaux, notamment les bourdons, qui présentent des facilités d'élevage. Plusieurs caractéristiques des défenses immunitaires connues chez les insectes solitaires ont ainsi été démontrées chez les insectes sociaux, notamment l'existence d'une réponse immunitaire efficace contre les pathogènes, le caractère coûteux des défenses immunitaires, ou encore l'influence des modes de reproduction sur l'investissement immunitaire (Moret & Schmid-Hempel, 2000; Vainio et al., 2004; Baer et al., 2005; Calleri et al., 2007). Mais l'étude des défenses immunitaires chez les insectes sociaux est également intéressante en raison des caractères particuliers de leur vie sociale.

Nous avons cité plusieurs exemples d'adaptations comportementales réduisant les risques de parasitisme. Les défenses immunitaires chez les insectes sociaux restent toutefois la dernière ligne de défense en cas d'infection parasitaire, et on peut s'attendre à ce que leur évolution soit également modulée par la forte pression parasitaire liée à leur vie sociale. En particulier, si l'effet des parasites augmente avec la taille du groupe, l'investissement immunitaire devrait lui aussi être accru (Alexander, 1974). Cette prédiction a été vérifiée au niveau intra et interspécifique dans diverses espèces de vertébrés et d'invertébrés (Coté & Poulin, 1995; Moller et al., 2001), mais certains résultats vont à l'encontre de l'hypothèse initiale, qui apparaît trop simpliste (Wilson et al., 2003). Des modèles mathématiques suggèrent que la distance entre les groupes sociaux, en réduisant la transmission inter-groupes, pourrait compenser les risques élevés de transmission au sein des groupes (Wilson et al., 2003).

Ces études s'intéressent au niveau moyen de défenses immunitaires des animaux sociaux. Il semble également important de prendre en compte ce qui se passe à l'intérieur des groupes, en particulier la variabilité dans les défenses immunitaires et les interactions

entre les individus. Une caractéristique fondamentale des insectes sociaux est la division du travail (Encadré 3), qui est un facteur majeur de variabilité individuelle. Il existe d'abord une division de la reproduction : une minorité seulement des individus produit des œufs, tandis que les autres, (souvent totalement ou partiellement stériles), assurent les autres tâches. De plus, le travail est réparti de manière dissymétrique entre les individus non reproducteurs (ouvrières chez les Hyménoptères), qui réalisent certaines tâches de manière prédominante.

Divers arguments indiquent que la division du travail module les effets du parasitisme d'un point de vue comportemental. En effet, dans le cadre de la division du travail, la fréquence des interactions entre les individus dépend de leur âge, de la fonction qu'ils remplissent dans la colonie, et des déplacements associés. Ces paramètres conditionnent alors les modes et les voies de transmission des parasites au sein de la colonie. Des travaux expérimentaux chez les abeilles et les bourdons notamment, associés à des modèles théoriques, ont montré que la division du travail peut en effet affecter la dynamique spatiale et temporelle des infections parasitaires (Schmid-Hempel, 1998). Il est aussi possible que la division du travail influence la résistance de la colonie par le biais de variations dans les défenses immunitaires. Cette thèse étudie certains aspects de la variation immunitaire dans le cadre de la division du travail, à la fois concernant la reproduction et les autres tâches.

3. Défenses immunitaires et division du travail

Nous avons abordé la question du lien entre les défenses immunitaires et la division du travail de deux manières. D'une part nous avons étudié certaines conséquences de la division du travail sur les défenses immunitaires, en ce qui concerne les traits d'histoire de vie des individus et leurs relations sociales. D'autre part, il nous a semblé intéressant de prendre en compte les défenses immunitaires pour comprendre la division du travail. En effet, l'organisation sociale est probablement modulée par la pression parasitaire et la nécessité de développer des défenses immunitaires efficaces. L'étude des défenses immunitaires pourrait donc apporter un éclairage sur des aspects encore mal compris de la division du travail.

3.1. Défenses immunitaires et division du travail reproducteur

Le partage de la reproduction définit le stade eusocial. Elle implique que certains individus renoncent à leur propre reproduction au profit d'autres individus, ce qui suscite des questions majeures du point de vue évolutif. Dans de nombreuses espèces, le devenir des individus est déterminé très tôt dans leur développement (Encadré 3), et leurs options reproductrices sont contraintes par leur phénotype. Mais dans certaines espèces les individus sont totipotents, et malgré tout la plupart ne se reproduisent pas. Il existe alors des conflits potentiels entre les individus pour l'accès à la reproduction, qui sont, selon les cas, exprimés ou non. Ces espèces sont donc des modèles clé pour comprendre comment le partage de la reproduction a pu évoluer et comment ces conflits sont gérés, qui sont des questions fondamentales pour l'étude des insectes sociaux.

L'étude du coût des conflits reproducteurs est nécessaire pour comprendre l'évolution des modes de partage de la reproduction. Etudier les défenses immunitaires peut fournir une approche pour mesurer le coût de ces conflits. Ce point sera développé dans la première partie de ce manuscrit, où nous présenterons une étude de l'impact des conflits reproducteurs sur le travail et les défenses immunitaires dans une espèce de fourmis sans reine, *Diacamma sp* Nilgiri.

La division du travail chez les insectes sociaux

L'eusocialité est le stade le plus avancé de la vie en société (Wilson, 1971). Elle est définie par trois critères :

- chevauchement des générations : plusieurs générations cohabitent dans une colonie
- coopération dans le soin aux jeunes
- division du travail reproducteur : des individus sont spécialisés dans la reproduction, les autres ne reproduisant pas et pouvant être totalement ou partiellement stériles.

Le stade eusocial se rencontre chez certains mammifères et oiseaux (Stacey & Koenig, 1990; Solomon & French, 1997) et dans de nombreuses sociétés d'insectes, en particulier les Isoptères (termites) et Hyménoptères.

Division du travail reproducteur

Les Hyménoptères présentent un système de détermination du sexe haplo-diploïde : les mâles sont issus d'ovocytes non fécondés, donc haploïdes, tandis que les femelles se développent à partir d'œufs fécondés diploïdes (Wilson, 1971). Les mâles ne travaillent pas, ils sont uniquement dévolus à la fonction reproductrice et meurent peu de temps après l'accouplement. Pour les femelles le devenir est déterminé soit au cours du développement larvaire par l'apport nutritionnel, soit au cours de la vie adulte (Keller & Vargo, 1993). Dans le premier cas, qui caractérise les guêpes dites évoluées (les Vespidae et quelques Polistinae) et la plupart des abeilles sociales et des fourmis, les larves les plus nourries se métamorphosent en reines et les autres suivent la voie ouvrière. Dans le deuxième cas (espèces *primitivement* eusociales), rencontré chez des guêpes (les Polistinae), certaines abeilles et bourdons et une centaine d'espèces de fourmis dites « fourmis sans reine », tous les individus sont identiques à l'éclosion avec le même potentiel reproducteur. La division du travail reproducteur implique alors des mécanismes comportementaux complexes, incluant des interactions agressives et des processus de communication.

Chez les Isoptères, tous les individus sont diploïdes. Le développement est hétérométabole, et les larves issues des œufs (mâles et femelles) peuvent subir trois destinées différentes en donnant des ouvriers, des soldats ou des imagos ailés (reproducteurs fondant les nouvelles colonies). Chaque colonie possède ainsi un couple royal, reine et roi. Il existe cependant une grande plasticité, rendant l'organisation coloniale des termites très complexe. Ainsi, certains individus engagés dans la voie sexuée peuvent subir une mue régressive et devenir des faux-ouvriers. Dans de très nombreuses familles de termites, la disparition de la reine ou du roi peut entraîner la sexualisation d'immatures, qui deviennent alors des reproducteurs néoténiques.

Division du travail non reproducteur

Une colonie d'Hyménoptères contient une ou plusieurs femelles reproductrices, du couvain (ensemble des œufs, larves et pupes), des ouvrières (femelles ne participant pas à la reproduction) et éventuellement des sexués mâles et femelles. Les ouvrières assurent les tâches de la colonie : élevage du couvain, entretien et défense du nid, récolte de nourriture. Le comportement individuel peut varier de manière très importante d'une ouvrière à l'autre, les ouvrières réalisant souvent certaines tâches de manière prédominante. Il est ainsi possible de définir des groupes d'ouvrières présentant un profil comportemental proche, parfois appelés castes comportementales. Il existe donc une division du travail non reproducteur, ou polyéthisme (Hölldobler & Wilson, 1990). Depuis que ce phénomène a été décrit, les chercheurs ont essayé de relier les comportements des ouvrières à leurs caractéristiques individuelles.

Le premier paramètre caractérisant les ouvrières est leur morphologie. La variation de taille peut être continue ou discontinue, donnant alors des castes (au sens large) distinctes. L'existence d'un polyéthisme morphologique, correspondant à une différence de comportements entre les castes, a été montrée dans de nombreuses espèces. Dans les cas de polymorphisme continu, la relation entre la taille des ouvrières et leur comportement apparaît beaucoup plus floue. Chez les Isoptères, en plus des ouvriers et ouvrières, il existe une caste de soldats extrêmement spécialisée, qui n'a pas d'équivalent chez les Hyménoptères sociaux et qui a un rôle uniquement défensif.

L'âge des ouvrières est un autre facteur important dans la division du travail. Le polyéthisme d'âge est particulièrement bien connu chez les abeilles (Winston, 1987) et existe également chez les fourmis (Hölldobler & Wilson, 1990). De manière générale, les jeunes ouvrières assurent le soin au couvain au centre du nid, puis remplissent peu à peu des tâches plus périphériques, comme l'entretien du nid, et occupent à la fin de leur vie le rôle de fourrageuses. Ces deux facteurs, âge et morphologie, n'expliquent cependant qu'une partie de la division du travail entre les ouvrières. Il existe une importante variabilité individuelle, qui cache peut-être des facteurs méconnus du comportement des ouvrières (Lenoir, 1987).

Encadré 3 : La division du travail chez les insectes sociaux

3.2. Défenses immunitaires et division du travail entre les ouvrières

Toutes les ouvrières ne sont pas équivalentes, mais on trouve généralement des groupes d'ouvrières spécialisées dans un ensemble de tâches, par exemple, les ouvrières qui assurent les tâches externes (collecte de nourriture, évacuation des déchets, défense du nid...) ou les nourrices qui s'occupent du couvain (léchage, nourrissage, déplacement...). La répartition des ouvrières dans les groupes comportementaux (appelés castes) est principalement influencée par l'âge et la morphologie (Encadré 2).

Les fonctions assurées par les différentes catégories d'individus non reproducteurs au sein de la colonie sont associées à des contraintes sélectives distinctes. De nombreux travaux ont étudié comment ces contraintes influencent l'évolution de traits phénotypiques, concernant notamment la morphologie, l'anatomie ou le comportement (Hölldobler & Wilson, 1990). Les différentes fonctions sociales peuvent également impliquer des stratégies différentes d'utilisation des ressources, susceptibles d'affecter l'investissement immunitaire. Dans la deuxième partie de cette thèse nous nous sommes intéressés au lien entre les défenses immunitaires et l'activité de fourragement chez *Cataglyphis velox* (Formicinae).

Par ailleurs, l'étude de la variation dans les défenses immunitaires pourrait aider à comprendre certains aspects de la division du travail. Par exemple, il existe une importante variation entre les ouvrières dans le niveau d'activité, dont la signification pour le fonctionnement de la colonie est encore mal compris. Puisqu'il existe un compromis entre travail et défenses immunitaires, cette variation pourrait être à l'origine d'une hétérogénéité dans le niveau de défenses immunitaires, favorable dans certains cas à la résistance de la colonie aux infections parasitaires. Nous avons testé, en troisième partie, l'hypothèse d'un lien entre le niveau d'activité des ouvrières de *Cataglyphis velox* et leur défenses immunitaires.

3.3. Modèles biologiques utilisés

Parmi les insectes sociaux, les fourmis possèdent les modes d'organisation sociale et de division du travail les plus diversifiés, ce qui en fait des modèles pertinents pour étudier l'évolution des défenses immunitaires en lien avec la division du travail. Bien que les approches immunologiques se soient développées récemment chez les insectes sociaux, les études chez les fourmis restent peu nombreuses. Ceci est lié entre autres à leur petite taille, qui nécessite d'adapter les techniques de mesures des défenses immunitaires développées chez les autres insectes (Encadré 3). Dans cette thèse nous avons utilisé deux espèces de fourmis, *Diacamma nilgiri* et *Cataglyphis velox*, qui présentent des facilités de manipulation en laboratoire et de mesure des défenses immunitaires.

Partie I : Impact des conflits reproducteurs sur le travail et les défenses immunitaires chez la fourmi sans reine

***Diacamma sp.* from Nilgiri**

(Article 1 en annexe)

1. Problématique

La socialité est caractérisée par l'existence d'un biais reproducteur entre les individus constituant le groupe. Chez les vertébrés et les insectes sociaux *primitivement* eusociaux (Encadré 3), la division du travail reproducteur est associée à des conflits, et de nombreux exemples d'agressions ont été décrits (Keller & Vargo, 1993; Emlen, 1995; Mock & Parker, 1997; Peeters, 1997). Dans les espèces où il existe des castes reproductrices les ouvrières sont totalement ou partiellement stériles, ce qui limite les conflits. Il existe cependant des conflits potentiels, par exemple pour la production de mâles, mais ils sont en réalité rarement exprimés. Pour expliquer cela, l'hypothèse la plus probable est que ces conflits sont coûteux, favorisant l'évolution d'autres modes de partage de la reproduction (Ratnieks & Reeve, 1992; Bourke & Franks, 1995).

Le coût des conflits reproducteurs a été peu estimé, et essentiellement sur le travail au sein de la colonie (Cole, 1986). Une étude plus récente suggère également un coût physiologique de ces conflits en montrant un impact sur la dépense énergétique (Gobin et al., 2003). Nous avons choisi d'étudier l'impact des conflits à la fois sur le travail et les défenses immunitaires, deux paramètres affectant la valeur sélective inclusive des ouvrières.

2. Modèle biologique et méthodes employées

Les fourmis sans reine sont un modèle intéressant pour notre problématique car elles présentent des conflits importants : toutes les ouvrières sont totipotentes et des interactions agressives permettent la mise en place d'une hiérarchie dans laquelle seule(s) la ou les femelles dominant(e)s se reproduisent. Dans la plupart des cas, les agressions cessent lorsque la hiérarchie est établie et la régulation de la reproduction est ensuite assurée via des signaux chimiques, ce qui appuie l'hypothèse d'un caractère coûteux de ces conflits. Le modèle utilisé est une fourmi ponérine *Diacamma sp.* Nilgiri dans laquelle on peut manipuler le niveau de conflit à l'intérieur de la colonie. Dans cette espèce, la femelle dominante est la seule ouvrière fécondée (gamergate) et monopolise la reproduction. Nous avons déclenché expérimentalement des conflits en divisant chacune des 20 colonies étudiées en deux groupes : un groupe contrôle de 80 ouvrières contenant la gamergate et un groupe orphelin

de même taille, dans lequel on s'attend à un niveau d'agressivité élevé jusqu'à ce qu'une nouvelle dominante soit établie.

Le niveau de conflits à l'intérieur des groupes a été évalué par le nombre d'agressions relevées (Figure 2). Pour cela, chaque groupe a été observé durant une heure par jour durant toute la durée de l'expérience. De plus, la quantité de travail fournie par les ouvrières a été estimée dans 14 colonies. Pour cela, nous avons réalisé deux fois par jour un relevé instantané du comportement de chaque ouvrière (méthode du « scan sampling »). Pour mesurer l'immunocompétence des ouvrières, nous leur avons injecté une dose de bactéries *Escherichia coli*, dont la quantité dans l'hémolymphe est mesurée 10 heures après (Figure 3).

Nous avons choisi d'évaluer le coût des conflits sur l'immunocompétence des ouvrières à deux temps différents : 8 jours et 15 jours après la sociotomie. La manipulation a été réalisée à 8 jours pour 5 colonies et à 15 jours pour 7 colonies. Dans les 8 autres colonies, le test a été fait sur un lot d'ouvrières à 8 jours, et sur un autre lot à 15 jours.

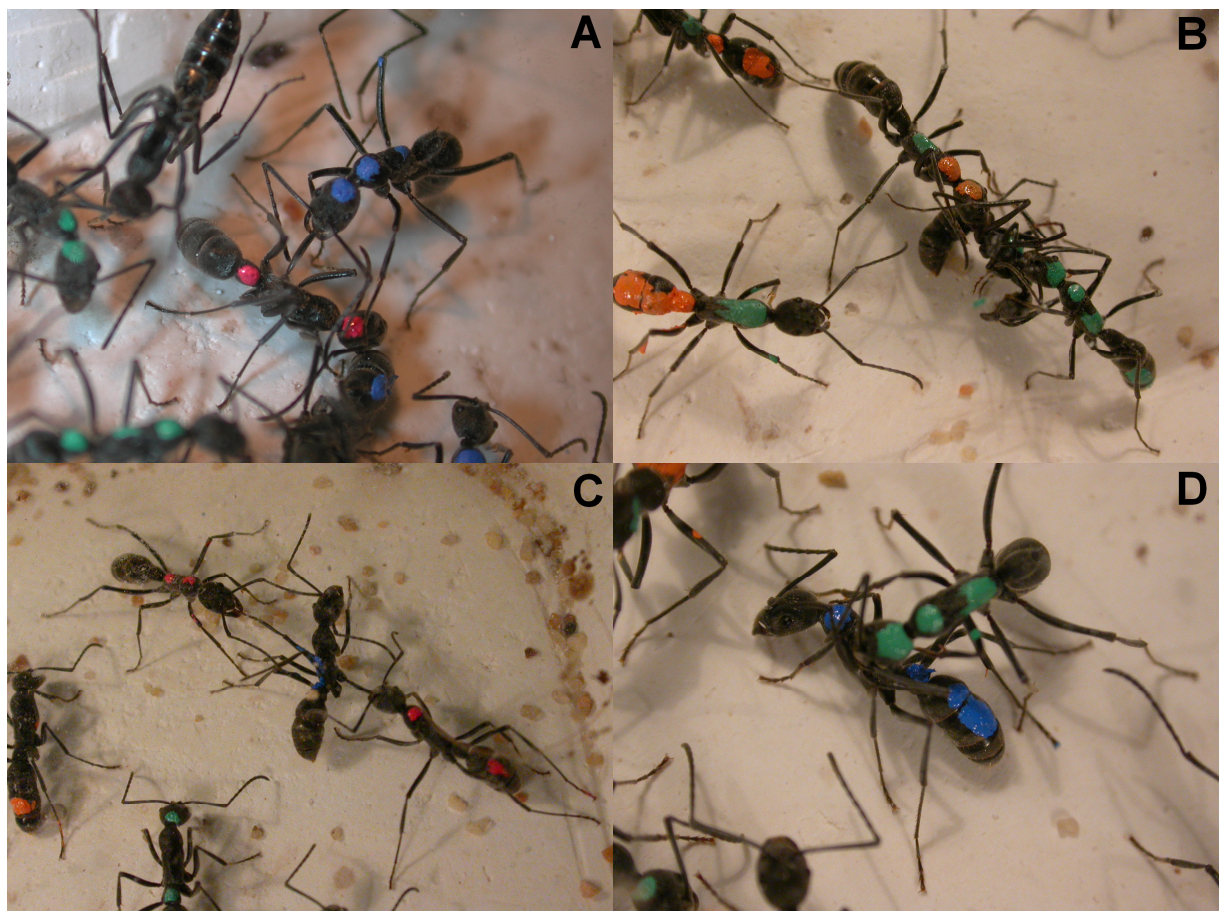


Figure 2 : Agressions observées dans les groupes orphelins. A : morsure ; B et C: immobilisation ; D : attaque thoracique (morsures au niveau des gemmes, appendices thoraciques)

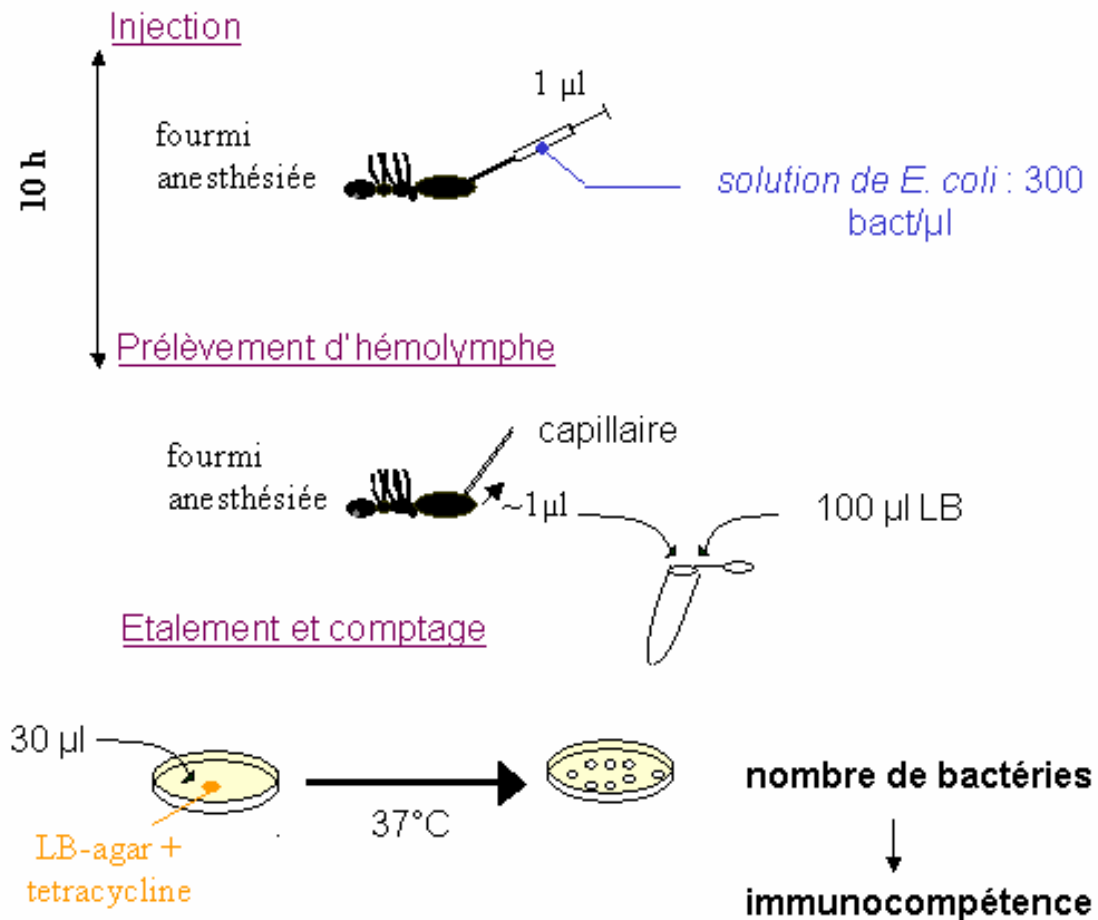


Figure 3 : Protocole. L'immunocompétence est évaluée par la persistance d'une infection bactérienne

3. Principaux résultats

Dans toutes les colonies étudiées, la manipulation a provoqué le développement de conflits importants dans les groupes orphelins, jusqu'à 8 jours en moyenne après la sociotomie. L'analyse des comportements a montré un taux plus faible de travail et en particulier de soin au couvain dans les groupes affectés par les conflits. Concernant les défenses immunitaires, la différence entre les groupes témoins et orphelins n'était pas significative 8 jours après la sociotomie. Cependant, nous avons observé une immunocompétence plus faible dans les groupes orphelins que dans les groupes témoin 15 jours après sociotomie. Ceci suggère l'existence d'un coût des conflits sur les défenses immunitaires.

De plus, l'intensité de cette immunosuppression ne dépendait pas du niveau d'agressivité dans les groupes orphelins, et les ouvrières non impliquées dans les conflits semblaient aussi affectées que celles qui recevaient ou donnaient beaucoup d'agressions. Le coût des conflits ne semblait donc pas directement lié aux agressions. Une des hypothèses proposées est que la réduction d'immunocompétence pourrait être due à un phénomène de stress lié à l'absence de gamergate. Il est possible également que les conflits induisent pour les ouvrières des coûts de différente nature selon leur niveau d'engagement dans la compétition pour la reproduction. Celles qui participent directement aux conflits, souvent les plus jeunes, pourraient subir un coût lié à une dépense énergétique accrue et aux dommages physiques liées aux agressions. Les autres ouvrières, bien que non directement agressées, semblaient également affectées : l'observation a montré qu'elles étaient fréquemment « bousculées », perturbées dans leur travail, ce qui pourrait causer un état de stress, équivalent à ce qui est connu chez les subordonnés dans les espèces sociales de vertébrés.

Le fait qu'une immuno-suppression soit observée 15 jours après la sociotomie, c'est-à-dire après la fin des conflits, suggère que les conflits reproducteurs pourraient avoir des conséquences négatives sur la viabilité de la colonie non seulement durant la courte période où les agressions sont manifestes, mais également sur une plus longue échelle de temps. De même, une diminution des soins au couvain, même pendant une période courte, peut avoir des conséquences à long terme si elle entraîne un retard dans le développement ou la mort d'une partie du couvain. Ceci d'autant plus que la production de nouvelles ouvrières connaît inévitablement un délai, le temps que la nouvelle reproductrice s'accouple et commence à pondre. Il serait donc intéressant de prolonger notre travail en étudiant les coûts des conflits sur les colonies à plus long terme. Si ces coûts ont un impact important sur le succès de la colonie, ils pourraient expliquer que les conflits reproducteurs aient été contre-sélectionnés dans de nombreuses espèces.

Il faut alors s'interroger sur la signification de l'hétérogénéité entre espèces dans les modes de régulation de la reproduction. On prédit par exemple qu'une hiérarchie entre les ouvrières en présence de la reproductrice puisse être maintenue malgré ses coûts si les bénéfices (reprise rapide de la ponte par la ou les ouvrières dominantes lorsque la reproductrice disparaît) sont suffisants. En effet on observe plus fréquemment une hiérarchie dans les espèces où les ouvrières peuvent s'accoupler et donc remplacer la reproductrice (Gobin et al., 2003). De manière plus générale, il faut prendre en compte les traits particuliers de chaque espèce pour comprendre les coûts et les bénéfices des différentes stratégies et donc l'évolution des modes de régulation de la reproduction.

Partie II : Plasticité phénotypique dans les défenses immunitaires en lien avec le fourragement chez la fourmi *Cataglyphis velox*

(Article 2 en annexe)

1. Problématique

A l'échelle individuelle, l'investissement dans les défenses immunitaires est, d'un côté, limité par les ressources disponibles qui sont partagées avec les autres postes de dépenses énergétiques, et, de l'autre, d'autant favorisé que les bénéfices sont importants. Ceux-ci dépendent à la fois de l'intensité de l'exposition aux parasites et des pressions de sélection qui s'exercent sur l'individu. La stratégie d'optimisation des ressources dépend alors du schéma d'histoire de vie de l'individu (Sheldon & Verhulst, 1996; Zuk & Stoehr, 2002).

La théorie de la sénescence prédit que l'investissement dans les traits liés à la survie, comme les défenses immunitaires, diminue avec l'âge d'autant plus rapidement que la mortalité extrinsèque est élevée, car il n'y a pas de sélection pour la survie si celle-ci est peu probable à plus ou moins court terme (Rose, 1991). Ainsi, cette théorie prédit un investissement immunitaire plus élevé pour les femelles que pour les mâles d'insectes (qui vivent souvent moins longtemps), ce qui est généralement vérifié (Schmid-Hempel, 2005). Entre les ouvrières, qui ne se reproduisent pas, il existe également des différences dans le niveau de sélection pour la survie susceptibles d'influencer l'investissement immunitaire. Ainsi, un polyéthisme lié à l'âge est vérifié dans de nombreuses espèces. Les ouvrières les plus jeunes assurent les tâches collectives à l'intérieur du nid (en particulier le soin au couvain) et deviennent fourrageuses en vieillissant, ce qui est associé à une augmentation considérable de la mortalité extrinsèque (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1984). La théorie de la sénescence prédit donc une diminution de l'investissement immunitaire au moment de cette transition.

Par ailleurs, si l'on s'intéresse aux modifications induites par le fourragement, d'autres contraintes apparaissent, qui peuvent agir sur l'investissement immunitaire. D'abord, en conditions naturelles, la collecte de nourriture implique une forte dépense énergétique. Ensuite, les ouvrières qui sortent du nid pourraient être plus exposées à certains parasites que celles restant à l'intérieur du nid. Comme elles ont en plus un risque élevé de blessures, sources d'infections, les fourrageuses sont l'une des sources d'entrée de pathogènes dans la colonie (Schmid-Hempel, 1998). De ce point de vue, on devrait donc s'attendre à ce que les fourrageuses présentent une immunocompétence élevée, notamment pour limiter les risques de contamination du nid.

2. Modèle biologique et méthodes employées

Ces deux hypothèses conduisent donc à des prédictions opposées. Nous avons choisi de tester l'existence d'une différence dans les paramètres immunitaires entre les fourrageuses et les ouvrières internes chez *Cataglyphis velox* (Figure 4). *Cataglyphis* est un genre de fourmis thermophiles (les ouvrières fourragent aux heures les plus chaudes de la journée) dont les fourrageuses présentent une mortalité élevée (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1984). Comme nous souhaitions tester des différences dans l'investissement immunitaire, il était nécessaire de limiter l'effet des facteurs proximaux liés au fourragement, tels que la dépense énergétique et la présence de pathogènes, qui peuvent modifier les paramètres immunitaires. L'expérience a été menée en laboratoire avec une petite aire de fourragement, ce qui réduit les différences dans les conditions subies par les ouvrières à l'extérieur et à l'intérieur du nid. De plus, les mesures ont été réalisées en deux temps (Figure 5). Nous avons marqué les fourrageuses des colonies étudiées, puis les avons retirées afin de comparer leurs défenses immunitaires avec celles d'un lot d'environ 30 ouvrières prélevées au hasard. Durant les 7 jours suivants, des fourmis intra-nidales sont devenues fourrageuses, et à l'issue de cette période elles ont également subi les mesures de défenses immunitaires avec un deuxième lot d'ouvrières internes. Nous pouvons alors être certains que les fourrageuses de cette deuxième série n'ont connu qu'un temps court de fourragement, et uniquement dans des conditions de laboratoire.



Figure 4 : Ouvrières de *Cataglyphis velox*

Marquage des
fourrageuses

= 1^{ère} série de
fourrageuses

30 ouvrières
internes

Marquage des
nouvelles fourrageuses

7 jours

= 2^{ème} série de
fourrageuses

30 ouvrières
internes

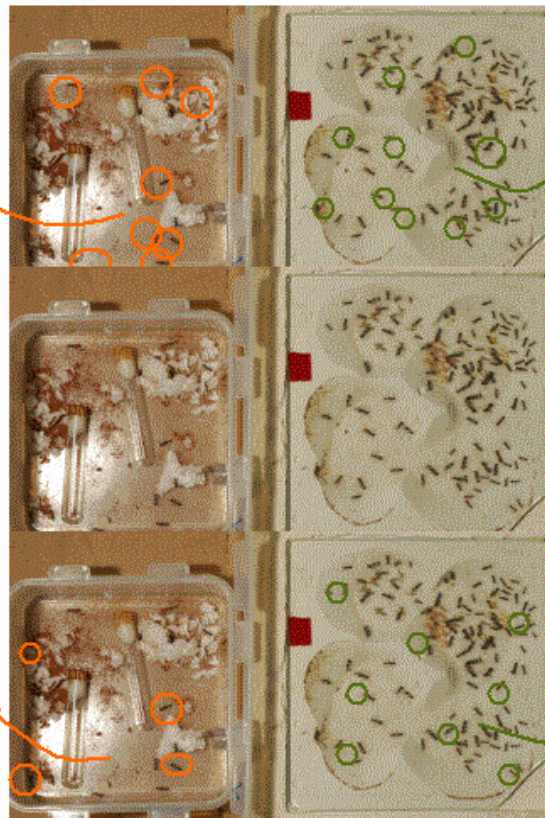


Figure 5 : Protocole expérimental

Dans de nombreuses espèces de fourmis il existe une variabilité importante dans la taille des ouvrières dont l'effet sur les paramètres immunitaires a été peu étudié jusqu'ici. Chez *Cataglyphis velox* la gamme de taille est importante (de 4,5 à 12 mm, Figure 4) et continue, ce qui permet de contrôler le facteur taille en analysant son effet sur les niveaux de défenses immunitaires des ouvrières. Dans cette espèce il a également été montré que les ouvrières de grande taille sont plus représentées parmi les fourrageuses (Cerdá & Retana, 1997). Les différents facteurs, taille, âge et activité sont donc étroitement imbriqués, comme cela est souvent le cas chez les fourmis.

Dans cette étude, le niveau de défenses immunitaires a été évalué par les quantités dans l'hémolymphe de deux enzymes importantes du système immunitaire, la phénoloxydase (PO) et la prophénoloxydase (PPO). La PPO est la proenzyme (en réserve) tandis que la PO est l'enzyme réellement active (Encadré 1 et Figure 6), c'est pourquoi il est intéressant de les étudier simultanément.

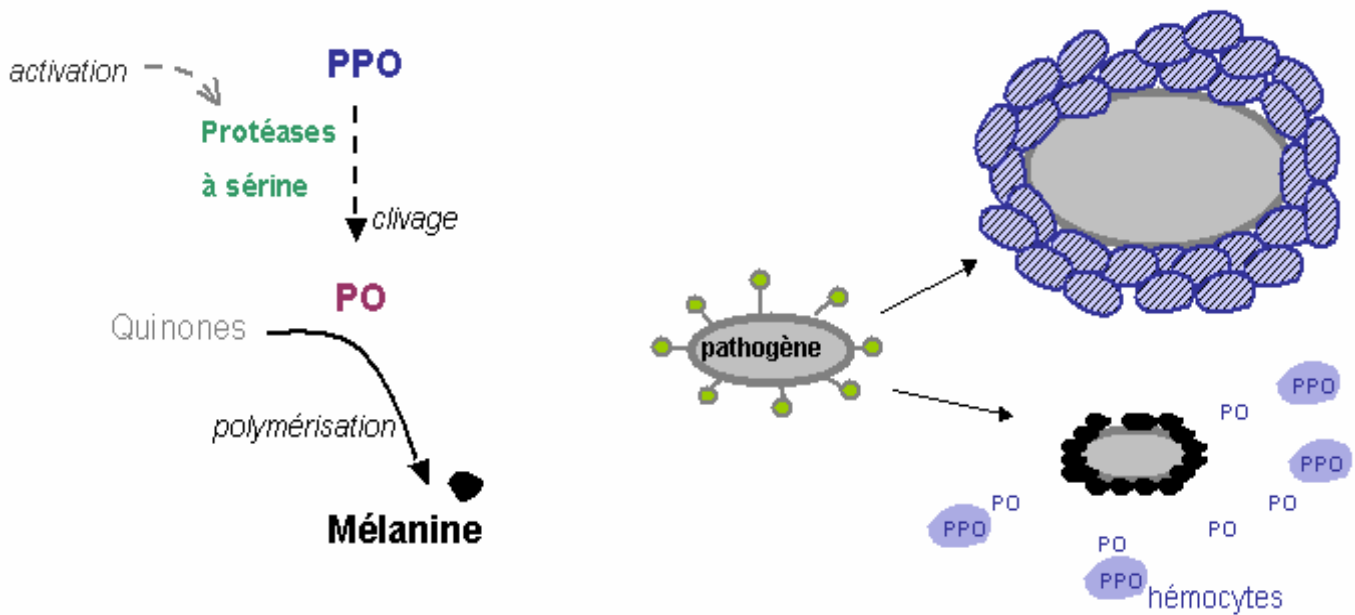


Figure 6 : Le système phénoloxydase-prophénoloxydase.

A gauche, la cascade enzymatique conduisant à la polymérisation de mélanine

A droite, la production des deux types de capsules :

- en haut, capsule multi-cellulaire formée de l'agrégation autour d'un corps étranger de grande taille (œuf de parasitoïde par exemple) de plusieurs couches d'hémocytes qui sont ensuite mélanisés (processus schématisé par les hachures noires)
- en bas, capsule mélanique simple.

3. Principaux résultats

Un niveau plus élevé de PO dans l'hémolymphe a été trouvé pour les fourrageuses. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'une augmentation des défenses immunitaires en lien avec l'exposition accrue aux pathogènes pour les fourrageuses. Cette différence a été trouvée pour les deux séries d'ouvrières prélevées, donc ne résulte vraisemblablement pas des conditions subies par les ouvrières à l'extérieur du nid. Elle suggère l'existence d'une plasticité phénotypique adaptative au moment de la transition vers le fourragement. On ne peut cependant pas exclure l'hypothèse d'une variabilité pré-existante parmi les ouvrières internes, associée à une sortie des ouvrières les plus résistantes. Toutefois, dans ce cas, la deuxième série d'ouvrières internes aurait présenté des niveaux de PO moyens plus faibles que la première série, ce qui n'a pas été observé.

A l'inverse, les fourrageuses et les ouvrières internes présentaient des niveaux similaires de PPO. La différence dans les résultats trouvés pour les deux enzymes pourrait être liée au coût immunopathogénique supposé de la PO, qui produit des molécules cytotoxiques. La PPO, qui est inactive, n'engendre pas ces coûts. Or un processus de plasticité phénotypique sera d'autant plus sélectionné qu'il implique une ressource coûteuse. Il est donc plus probable que la PO ne soit produite qu'en cas de nécessité, et que les niveaux de PPO soient plus stables.

Enfin les niveaux de PO et PPO augmentent avec la taille des ouvrières, La corrélation est plus forte avec la PPO qu'avec la PO, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de contraintes plus fortes sur les niveaux de PO dans l'hémolymphe en raison de son coût immunopathogénique.

Partie III : Comportement individuel et variation immunitaire dans les colonies de *Cataglyphis velox*

(Article 3 en annexe)

1. Problématique

La théorie de la division du travail postule que la spécialisation des individus dans certaines tâches permet une meilleure efficacité dans la réalisation du travail, grâce à l'entraînement et à l'absence de perte de temps durant le changement de tâche. Une telle différenciation des individus est souvent observée dans les colonies, dès qu'elles sont composées de quelques dizaines d'individus, et concerne les travaux de soin au couvain, d'entretien, de défense et d'approvisionnement du nid (Hölldobler & Wilson, 1990).

La défense contre les pathogènes est une fonction importante à l'échelle de la colonie, et la protection du nid dépend du niveau d'immunocompétence de ses membres. Des travaux sur les abeilles ont par exemple montré que la résistance à une maladie à l'échelle de la colonie était corrélée au niveau de réponse immunitaire individuelle (Evans & Pettis, 2005). De plus, l'immunocompétence est un trait variable entre les individus, dont l'expression à l'échelle individuelle est coûteuse et soumise à un compromis avec les autres traits (Sheldon & Verhulst, 1996). La défense de la colonie contre les pathogènes pourrait être considérée comme une tâche coloniale, et on peut alors se demander dans quelle mesure les principes de la division du travail s'appliquent aux défenses immunitaires.

Des travaux récents chez les termites (Rosengaus et al., 2000; Rosengaus & Traniello, 2001) suggèrent que la distribution du niveau de défenses immunitaires dans la colonie est importante pour la survie du groupe. Par exemple, les termites survivent visiblement mieux à une infection lorsqu'ils se trouvent dans un groupe hétérogène du point de vue démographique : les individus de stades précoces, intrinsèquement moins résistants, semblent bénéficier de la présence d'individus plus âgés qui possèdent de meilleures défenses immunitaires (Rosengaus & Traniello, 2001). Dans les espèces de fourmis polymorphes, la distribution des individus dans les différentes classes morphologiques pourrait également influencer la résistance à l'échelle de la colonie (Tooby, 1982; Keller, 1995). L'hétérogénéité intra-coloniale du niveau de défenses immunitaires, liée au polymorphisme ou à la composition démographique, favoriserait donc dans certains cas la résistance de la colonie aux parasites. Différents mécanismes pourraient expliquer ce bénéfice. Chez les termites, un transfert social d'immunité semble possible : des termites mis en contact avec des congénères « immunisés » c'est-à-dire précédemment exposés à des doses non létales de pathogènes, présentent eux-mêmes une résistance accrue. Les

auteurs suggèrent que les individus échangent des facteurs antiseptiques présents dans le tube digestif ou sur la cuticule. Par exemple, les sécrétions antiseptiques des soldats pourraient être bénéfiques aux ouvrières dans la protection contre les pathogènes (Rosengaus et al., 2000). Dans une colonie structurée, on peut également penser que la présence d'individus résistants affecte la dynamique de transmission des pathogènes au sein du nid (Figure 7).

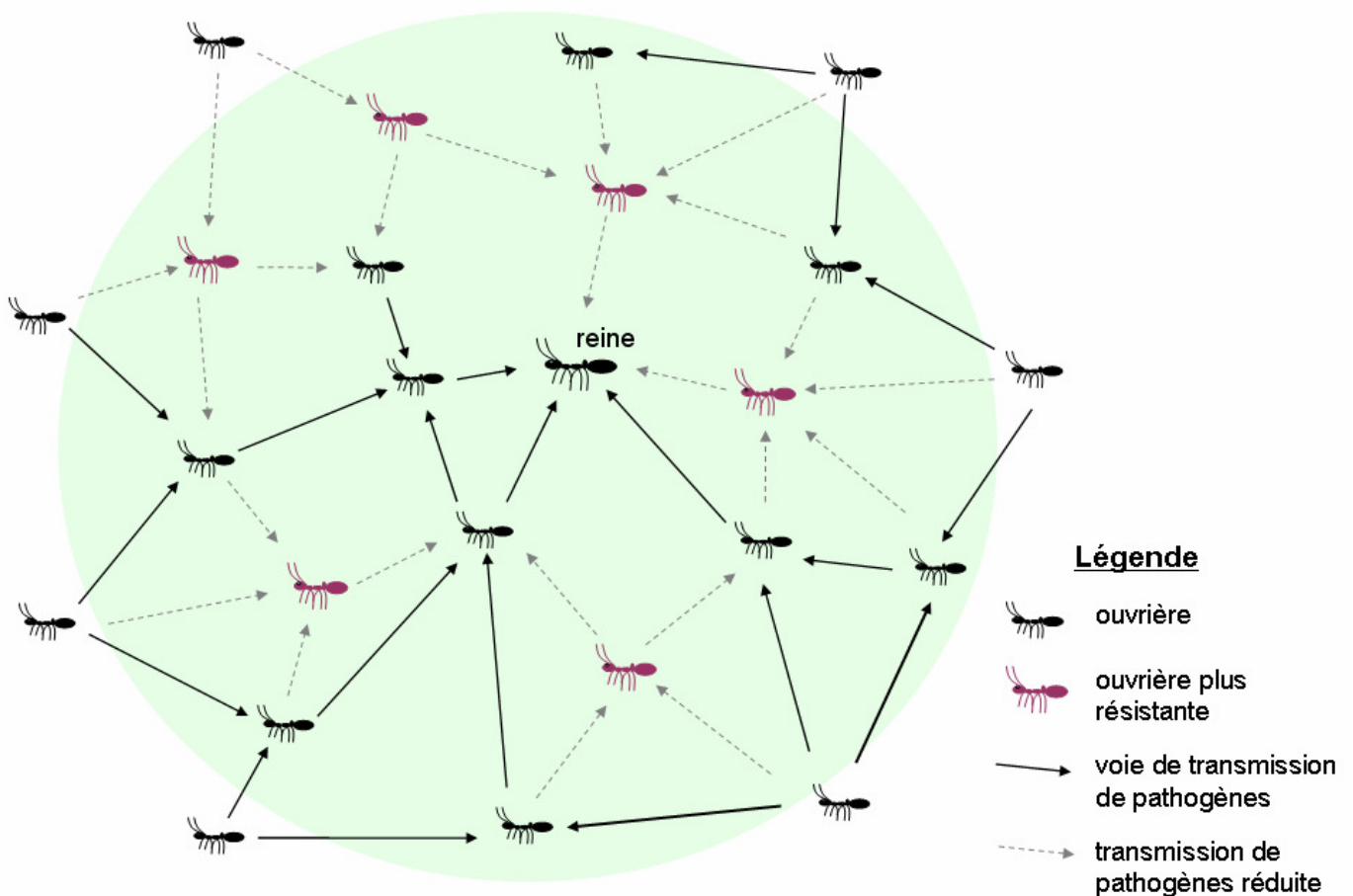


Figure 7 : Hypothèse proposée. La présence d'individus avec un niveau de défenses immunitaires élevé (en rouge), associée à une structuration spatiale du nid, pourrait limiter la propagation des pathogènes dans la colonie. En effet, les voies de transmission des pathogènes au sein de la colonie sont liées aux interactions entre les individus et en particulier aux échanges trophallactiques, qui ne se font pas au hasard, mais dépendent de la position et de la fonction des individus. Des individus plus résistants, donc moins susceptibles de transmettre l'infection, pourraient bloquer certaines voies de transmission et ainsi jouer un rôle de « barrière immunitaire ».

Pour les ouvrières adultes, qui ne se reproduisent pas, la principale fonction consommatrice de ressources et susceptible de limiter l'investissement immunitaire est la réalisation du travail. Un compromis entre activité de fourragement et immunité a ainsi été montré chez les bourdons (König & Schmid-Hempel, 1995; Doums & Schmid-Hempel, 2000). L'existence d'une variabilité dans le niveau d'activité entre les ouvrières pourrait alors s'accompagner de différences dans les défenses immunitaires. L'existence d'ouvrières majoritairement inactives a en effet été observée dans de nombreuses espèces de fourmis et est encore mal comprise (Robinson, 1992). L'hypothèse la plus couramment avancée est que ces ouvrières joueraient un rôle de réserve, et qu'elles seraient mobilisées en cas de besoin, lors d'un danger par exemple, ou suite à la perte d'une partie des ouvrières (Hölldobler & Wilson, 1990). Bien que ce rôle soit souvent évoqué, les arguments sont minces, parfois discutables, et certains résultats semblent plutôt le contredire.

Dans cette étude, nous avons fait l'hypothèse que les ouvrières inactives pourraient jouer un autre rôle : comme elles allouent moins de ressources dans une activité musculaire, elles seraient plus à même d'investir dans les défenses immunitaires. Elles pourraient alors contribuer au succès de la colonie en augmentant sa résistance.

2. Modèle biologique et méthode employée

Nous avons mené, chez *Cataglyphis velox*, une étude comportementale associée à des mesures immunitaires afin de répondre à trois questions : peut-on mettre en évidence des différences significatives dans les niveaux d'activité entre les ouvrières ? Si oui, est-ce que les ouvrières inactives jouent un rôle de réserve ? Enfin, ces ouvrières présentent-elles de meilleures défenses immunitaires ?

Une forte perturbation a été créée dans les colonies par le retrait de toutes les fourrageuses. Cet événement a été encadré de deux sessions d'observations comportementales (Figure 8). Ceci a permis d'établir pour chaque session et chaque ouvrière le budget-temps, qui décrit le pourcentage de temps occupé dans les différents comportements. Nous avons alors analysé les changements de comportement des ouvrières entre les deux sessions, en particulier concernant leur niveau d'activité. Nous nous sommes également intéressés à la manière dont les nouvelles fourrageuses étaient recrutées, et à l'éventuelle participation des ouvrières inactives.

A la fin de la deuxième session d'observation, nous avons mesuré les niveaux de PO et PPO dans l'hémolymphe de toutes les ouvrières, et nous avons testé l'existence d'un lien entre le taux d'inactivité et ces paramètres immunitaires.

3. Principaux résultats

L'analyse des budgets-temps a montré qu'il existait une variation significative dans les taux d'inactivité entre les ouvrières au sein d'une colonie. Les classifications hiérarchiques réalisées dans chaque colonie ont également montré que le taux d'inactivité était un facteur important de la variabilité entre les ouvrières. Il existe donc bien des ouvrières particulièrement inactives dans les colonies de *Cataglyphis velox*.



Figure 8: Intérieur d'un nid artificiel de *Cataglyphis velox*. Des ouvrières s'occupent du couvain, tandis que d'autres, sur le bord, sont inactives. Deux reines sont visibles, marquées d'un point blanc.

Les fourrageuses retirées ont été remplacées par de nouvelles fourrageuses, mais en moins grand nombre et moins présentes à l'extérieur du nid. Le prélèvement des fourrageuses n'a donc été que partiellement compensé par le reste de la colonie, et d'ailleurs le niveau d'activité global des ouvrières restant après la perturbation n'a augmenté que dans une colonie. De plus, les niveaux d'inactivité des individus (relatifs au reste de la colonie) sont fortement corrélés entre les deux sessions d'observation, ce qui indique que les profils des ouvrières concernant l'inactivité sont restés stables. D'après ces résultats, la fonction de réserve des ouvrières inactives semble improbable.

Enfin, le taux d'inactivité des ouvrières ne semble pas avoir d'effet sur les niveaux de PO et de PPO dans l'hémolymphe chez *Cataglyphis velox*. Notre hypothèse n'est donc pas validée. Il serait cependant intéressant de tester si les mêmes résultats seraient trouvés avec d'autres mesures de l'immunocompétence, comme la production de peptides anti-microbiens ou la résistance à des pathogènes. Par ailleurs, une variabilité importante dans les niveaux de PO et PPO existe au sein des colonies, en lien avec la taille des ouvrières, les grandes ouvrières ayant des valeurs plus élevées. La démographie coloniale pourrait ainsi avoir un effet sur la résistance de la colonie via la distribution des niveaux de défenses immunitaires, ce qui pourrait en retour influencer l'évolution du polymorphisme.

Synthèse et perspectives

Au cours de ce travail nous avons mis en évidence de plusieurs façons l'impact que peut avoir la division du travail sur les défenses immunitaires et l'intérêt de prendre en compte les défenses immunitaires dans l'étude de la socialité. Une variation dans les défenses a ainsi été observée :

- suite à des conflits sociaux engendrés par le partage de la reproduction
- en fonction des tâches réalisées par les ouvrières (internes/externes) et des pressions parasitaires associées
- en lien avec la taille des ouvrières dans une espèce polymorphe

Après avoir discuté de la validité de nos résultats et interprétations, nous essaierons donc de replacer nos résultats dans un cadre écologique et évolutif plus général. Pour cela nous réfléchirons aux différentes contraintes et facteurs proximaux agissant sur les défenses immunitaires et aux mécanismes de variation liés à l'environnement. Enfin, nous proposerons des pistes pour poursuivre l'étude des défenses immunitaires dans le cadre de la division du travail.

1. Mesures de l'immunocompétence : interprétations, validation

Les différentes méthodes utilisées pour mesurer les défenses immunitaires ont toutes leurs imprécisions et leurs limites. Il est nécessaire de tenir compte de ces difficultés dans l'interprétation des résultats.

La résistance face à un pathogène est mesurée soit par le taux de survie lors d'une infection, soit par le taux d'élimination/multiplication du pathogène dans l'organisme, ce que nous avons effectué dans notre première étude. Le choix du pathogène n'est pas anodin. Ainsi, selon le type de pathogène (bactérie, champignon...) les éléments du système immunitaire utilisés majoritairement sont différents. De plus, des interactions entre le génotype de l'hôte et celui du pathogène peuvent intervenir, impliquant notamment des molécules de reconnaissance. La résistance aux différents pathogènes varie donc de manière importante, rendant relative la mesure réalisée (Adamo, 2004). Les différents éléments du système immunitaire, peptides anti-microbiens, phénoloxydase, hémocytes, peuvent également être évalués séparément. Là encore, il s'avère que les mesures ne sont pas forcément corrélées (Rolff et al., 2005). Le résultat d'une étude dépend alors du test choisi, ce qui conduit à une nécessaire prudence dans les conclusions tirées.

L'utilisation des différents tests immunitaires se base souvent sur l'hypothèse que la concentration des différentes molécules ou cellules dans l'hémolymphe (PO, peptides anti-microbiens, hémocytes) est corrélée à la capacité à monter une réponse immunitaire efficace. Or il est possible qu'une variabilité dans les mesures immunitaires n'entraîne une résistance différente qu'à partir d'un certain seuil. De plus, les paramètres individuels, notamment la taille de l'individu, pourraient intervenir dans la relation entre mesures immunitaires et résistance. Chez *Cataglyphis velox* la concentration en phénoloxydase et prophénoloxydase est d'autant plus élevée que les ouvrières sont grandes (Parties II et III) : cela signifie-t-il que les grandes ouvrières sont plus résistantes ? Est-ce que l'immunocompétence est déterminée par la concentration dans l'hémolymphe ou par la quantité corporelle totale, dépendant du volume d'hémolymphe ? Est-ce que le risque d'exposition est corrélé à la surface corporelle ? Si c'est le cas, il faudrait prendre en compte le rapport surface/volume.

La difficulté d'interprétation des mesures immunitaires vient aussi parfois du manque d'études fonctionnelles sur le système immunitaire des insectes. Si les mécanismes moléculaires sont de mieux en mieux décryptés, trop peu d'informations quantitatives restent disponibles dans la littérature sur l'utilisation réelle des différents systèmes lors d'une infection et leur dynamique temporelle. Par exemple, dans l'interprétation de nos mesures de

phénoloxydase (PO) et de prophénoloxydase (PPO) (Parties II et III), de nombreuses questions sont restées en suspens : quelle quantité de PO est utilisée lors d'une infection ? Quelle proportion de PPO est convertie en PO ? La quantité initiale est-elle rétablie ensuite ? Si oui, en combien de temps ? Quelle est la durée de vie de ces enzymes ? La PPO est-elle produite tout au long de la vie de l'individu ? De plus, les caractéristiques du système immunitaire peuvent être différentes entre les groupes taxonomiques. Il apparaît donc nécessaire d'investir dans des études fonctionnelles, et ceci dans les différents groupes d'insectes.

Enfin, les éléments du système immunitaire peuvent être impliqués en même temps dans d'autres fonctions physiologiques. Ainsi, le système PO/ PPO intervient également dans la mélanisation de la cuticule et la cicatrisation des blessures (Siva-Jothy et al., 2005). Dans ce travail nous avons montré que la concentration de PO dans l'hémolymphe était plus élevée chez les fourrageuses que chez les ouvrières internes. Ceci peut s'interpréter comme la réponse à une exposition accrue aux pathogènes présents à l'extérieur du nid, mais aussi comme un phénomène associé à un épaissement de la cuticule (Wilson et al., 2001; Armitage & Siva-Jothy, 2005) qui augmenterait la protection contre la dessiccation et les blessures. Pour discriminer ces hypothèses il serait intéressant de mesurer l'épaisseur de la cuticule chez les deux types d'ouvrières.

Pour valider nos résultats, il apparaît donc nécessaire de répéter les expériences en associant différentes mesures, et en les confrontant à des tests de résistance, idéalement avec plusieurs pathogènes différents. Enfin, mesurer la résistance des individus ne suffit pas toujours. Pour certaines problématiques, il peut être utile d'évaluer parallèlement la résistance de la colonie. Concernant notre deuxième étude, il serait ainsi intéressant de tester si l'immunocompétence des individus exposés influence réellement la probabilité de contamination de la colonie.

2. Origine des variations immunitaires : coûts et facteurs proximaux

Pour expliquer la variabilité observée dans les défenses immunitaires, il est important de connaître les contraintes et les facteurs qui influent, à courte échelle de temps, sur les défenses immunitaires. On peut alors se demander si l'effet de ces facteurs proximaux est adaptatif.

De manière générale les variations observées dans les niveaux de défenses immunitaires sont liées à leurs coûts, qui sont multiples (Lochmiller & Deerenberg, 2000; Zuk & Stoehr, 2002). Les défenses immunitaires ont d'abord un coût énergétique, à la fois pour leur maintenance, c'est-à-dire la production des éléments constitutifs du système immunitaire, et leur utilisation, c'est-à-dire l'activation du système immunitaire en cas d'infection. Il existe aussi un coût immunopathogénique du système immunitaire. A cause de ces différents coûts, les défenses immunitaires sont susceptibles d'être affectées par les paramètres physiologiques, eux-mêmes influencés par de nombreux facteurs, externes et internes.

Un facteur est dit proximal s'il induit, directement et sur une courte échelle de temps, la variation observée. Ceci par opposition à un facteur ultime, qui induit une variation à une échelle évolutive par le biais de la sélection naturelle. Différents facteurs proximaux, internes ou externes, sont susceptibles d'expliquer une part de la variation dans les défenses immunitaires que nous avons observée au cours de cette étude.

En ce qui concerne les caractéristiques individuelles, nous avons mis en évidence, chez *Cataglyphis velox*, une corrélation positive entre taille et défenses immunitaires (Partie II et III). Celle-ci peut être due à des contraintes physiologiques. En effet l'activité métabolique par unité de masse est d'autant plus faible que la taille de l'organisme est grande, ce qui implique un coût de maintenance des tissus plus faible pour les grands individus et donc, éventuellement, une plus grande capacité à investir dans d'autres traits. Il est probable que les défenses immunitaires varient également avec l'âge des ouvrières. On observe généralement une détérioration des fonctions physiologiques avec l'âge. En ce qui concerne les défenses immunitaires, la situation apparaît très complexe (DeVeale et al., 2004), et cette problématique a été peu étudiée chez les insectes sociaux (Doums et al., 2002). Dans notre étude chez *Cataglyphis velox*, nous n'avons pas observé ce pattern classique de sénescence pour la PO et la PPO puisque les ouvrières les plus âgées (les fourrageuses) avaient des niveaux d'enzymes plus élevées que les autres (Partie II). La sénescence pourrait dans ce cas avoir été masquée par une augmentation des niveaux

d'enzymes liée à l'activité de fourragement. De manière générale, les différents effets (taille, âge et activité) sont étroitement imbriqués chez les ouvrières de fourmis. Pour poursuivre l'étude de l'effet de l'environnement physique et social sur les défenses immunitaires, ainsi que le lien entre comportement et défenses immunitaires, il est donc fondamental de connaître précisément les effets de la taille et de l'âge sur l'immunocompétence.

Le système immunitaire, en raison de son coût énergétique, est aussi affecté par le statut nutritionnel de l'organisme. Une raréfaction des ressources présentes dans l'environnement peut ainsi diminuer le niveau de défenses immunitaires. De même, un état de stress déclenché par l'environnement physique ou social peut aussi affecter le système immunitaire. Chez les vertébrés cet effet est bien connu : le stress correspond à l'activation de réseaux neuro-hormonaux et les hormones produites (corticoïdes) ont des effets immunosuppresseurs (Apanius, 1998). Des mécanismes similaires semblent exister chez les invertébrés (Ottaviani & Franceschi, 1996).

Ces effets proximaux peuvent être adaptatifs, du moins en partie. L'effet de la taille, par exemple, peut être mis en relation avec une éventuelle différence dans les rôles des ouvrières de différentes tailles dans l'espèce considérée. Chez *Cataglyphis velox* les grandes ouvrières ont une plus forte probabilité de devenir fourrageuses. Leurs niveaux élevés de PO et PPO pourraient être avantageux face aux risques d'infection à l'extérieur du nid (nous reviendrons sur ce point dans la partie suivante).

Concernant l'effet de l'âge, la question du rôle de la sélection naturelle dans le vieillissement est encore débattue. La théorie de la sénescence se base sur l'hypothèse que la sélection pour la survie décroît lorsque la majeure partie du succès reproducteur a été réalisée, entraînant une chute de l'investissement dans la maintenance du soma. Les défenses immunitaires ayant un coût énergétique, elles devraient être affectées si l'investissement dans les fonctions liées à la survie diminue avec l'âge. La détérioration des fonctions physiologiques avec l'âge n'est évidemment pas avantageuse, mais la vitesse de ce processus dépendrait des pressions de sélection. Chez les ouvrières des insectes sociaux, la sélection agit différemment puisqu'elles sont généralement stériles. Leur valeur sélective inclusive dépend essentiellement de leur contribution au fonctionnement de la colonie, qui peut augmenter avec l'âge si leur efficacité au travail bénéficie de l'expérience acquise. L'investissement dans la maintenance du soma pourrait alors être soumis à des contraintes différentes de celles agissant pour les organismes fertiles. Il serait donc intéressant de comparer les taux de sénescence pour différents traits entre les insectes sociaux et les insectes solitaires.

Le coût énergétique des défenses immunitaires est également invoqué pour expliquer la régulation négative du système immunitaire en cas de stress, dans une optique de

redistribution des ressources disponibles entre les différentes fonctions de l'organisme. Il est généralement considéré qu'à court terme cette réponse est adaptative car elle permet une mobilisation de l'énergie vers les fonctions prioritaires (notamment le système neuromusculaire). Le coût immunopathologique pourrait aussi être impliqué. Ainsi certains auteurs proposent que l'effet immunosuppresseur du stress permette de limiter les risques de réponse autoimmune liés à une hyperactivation du système immunitaire, qui sont plus élevés lorsque l'activité musculaire est importante (Räberg et al., 1998). Cependant un stress chronique serait néfaste (Räberg et al., 1998). Dans notre étude chez *Diacamma sp.* Niligiri (Partie I), l'immunodépression observée lors de la période de conflits, qui correspond à une modification de l'environnement social, pourrait être due à un phénomène de stress lié aux agressions et aux perturbations que subissent les ouvrières. Si les femelles prétendant au statut de gamergate peuvent bénéficier d'une ré-allocation de leurs ressources vers la compétition, un tel stress semble néfaste pour les autres ouvrières et la productivité de la colonie. Quoi qu'il en soit, à l'échelle du groupe, l'immuno-suppression induite par les conflits reproducteurs pourrait diminuer le succès de la colonie.

3. Variations immunitaires en lien avec l'environnement

Un des objectifs de l'immunologie évolutive est de comprendre la manière dont les défenses immunitaires ont été modulées par la sélection naturelle en réponse aux variations de l'environnement, par un processus d'adaptation. L'environnement, facteur ultime, est susceptible d'influer sur les défenses immunitaires à la fois par ses composantes biotiques (densité de pathogènes mais aussi environnement social) et abiotiques (par exemple risque de blessures). Une variation immunitaire en lien avec l'environnement peut être observée à l'échelle de l'organisme et à moyen terme. Elle correspond alors à un phénomène de plasticité phénotypique. Entre populations, les variations observées peuvent être dues à une plasticité phénotypique ou à une variation génétique, qui se produit sur une plus longue échelle de temps.

3.1. A l'échelle individuelle : intérêt de la plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique correspond à l'existence de différents phénotypes correspondant à un même génotype. Elle est dite adaptative si la régulation de l'expression du phénotype en fonction de l'environnement augmente la valeur sélective. L'environnement agit ici comme un signal, c'est le facteur ultime. La variation observée est ainsi « programmée génétiquement » car elle a été sélectionnée. La plasticité phénotypique peut intervenir à différents moments de la vie. Tôt dans la vie, les conditions environnementales peuvent influencer le développement de l'individu, et le phénotype sera ensuite stable. Le phénotype d'un individu peut également changer au cours de sa vie, en fonction de l'environnement auquel il est exposé.

L'intérêt d'une plasticité dans la fonction immunitaire est lié à ses coûts. Elle permet de développer les défenses uniquement lorsque c'est utile, et donc de limiter les coûts énergétiques et immunopathogéniques. Par exemple, la phénoloxydase entraîne la production de molécules toxiques, et cette propriété pourrait expliquer qu'elle soit maintenue en quantité très limitée comparée à la prophénoloxydase inactive, et uniquement produite en cas de besoin.

Concernant les défenses immunitaires, des cas variés de plasticité phénotypique adaptative ont été décrits chez les insectes (Nelson et al., 1998; Joop & Rolff, 2004; Jacot et al., 2005). Par exemple les individus présentent parfois une immunité accrue avant la saison de reproduction, ce qui peut être interprété comme une protection contre les maladies sexuellement transmissibles (Calleri et al., 2007). Une augmentation du niveau de défenses immunitaire avec la densité a été trouvée dans plusieurs espèces d'insectes (Reeson et al.,

1998; Barnes & Siva-Jothy, 2000; Wilson et al., 2001). Des phénomènes de plasticité trans-générationnelle ont même été montrés (Moret & Schmid-Hempel, 2001; Little et al., 2003). Notons que l'augmentation prophylactique des défenses en cas de blessure (Brey et al., 1993) peut être considérée comme une plasticité intervenant à court terme. Les défenses induites pourraient également correspondre à une plasticité phénotypique extrême : dans ce cas la présence de pathogènes est à la fois le facteur ultime et proximal. Le fait que la production de peptides anti-microbiens n'est déclenchée qu'au dernier moment, lors d'une exposition au pathogène, s'explique par son coût élevé (Moret, 2003).

De plus il semble exister des compromis au sein du système immunitaire des insectes (Cotter et al., 2004; Rantala & Roff, 2005). L'investissement relatif dans les différentes voies pourrait être modifié par des phénomènes de plasticité adaptative (Moret & Schmid-Hempel, 2001; Moret, 2003). En particulier, l'importance relative des défenses constitutives et induites pourrait moduler le coût des défenses immunitaires (Moret, 2003). Chez les vertébrés, de tels mécanismes de compensation entre les systèmes innés et acquis a déjà été montré (Räberg et al., 2002).

Les résultats de notre étude chez *Cataglyphis velox* (Partie II) suggèrent que le niveau plus élevé de PO des fourrageuses serait dû à une augmentation de cette enzyme au cours de la vie des ouvrières, soit de manière progressive, soit rapidement au moment de leur transition entre l'intérieur et l'extérieur du nid (Figure 9). Par ailleurs, la corrélation entre la concentration en PO et la taille des ouvrières peut également être associée au fait que les grandes ouvrières ont une probabilité plus élevée de devenir fourrageuses. Cette corrélation reflèterait alors un deuxième niveau de plasticité adaptative, cette fois précoce car exprimée au cours du développement post-embryonnaire.

L'existence d'une plasticité phénotypique des défenses immunitaires liée aux contraintes environnementales doit également être recherchée au sein de la caste reproductrice. En effet, la forte exposition aux pathogènes à l'extérieur du nid pourrait également influencer l'investissement immunitaire des reines, qui connaissent une période extra-nidale lors du vol nuptial et de la recherche d'un nouveau nid. L'hypothèse d'un niveau plus élevé de défenses immunitaires des gynes (sexuées femelles) avant leur sortie est actuellement testée dans notre laboratoire.

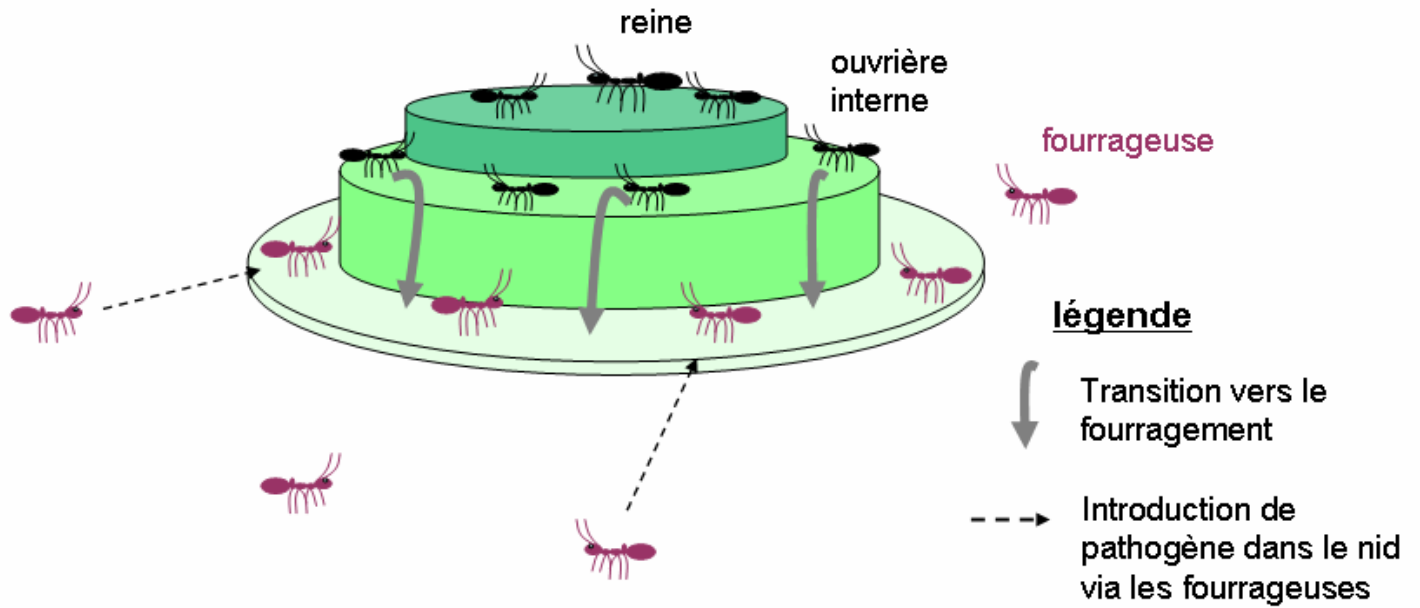


Figure 9 : Organisation spatiale d'un nid de fourmis. Des groupes d'ouvrières ayant des interactions privilégiées peuvent être reconnus :
- au centre du nid se trouve la reine avec les jeunes ouvrières nourrices (et le couvain).
- en périphérie se trouvent les ouvrières plus âgées assurant l'entretien du nid et le transfert de la nourriture rapportée par les fourrageuses.
- les fourrageuses sont les voies d'entrée des pathogènes auxquelles elles sont exposées à l'extérieur du nid.
La distance de transmission des pathogènes depuis l'extérieur du nid est donc la plus grande pour le groupe central. Une augmentation du niveau de PO au moment de la transition vers le fourragement pourrait permettre aux fourrageuses de résister aux pathogènes et donc de limiter l'infection de la colonie.

3.2. A l'échelle de la population : différents mécanismes impliqués

Des différences dans les niveaux de défenses immunitaires entre populations d'une même espèce peuvent être dues à une plasticité phénotypique, si les conditions environnementales présentes dans chaque population entraînent un investissement immunitaire différent. Par exemple des variations dans le niveau de PO entre des populations naturelles de gammarex semblent liées en partie à la fréquence de blessures (Plaistow et al., 2003). Il est possible aussi que, dans certains cas, la différence entre populations corresponde à une variation génétique, les pressions environnementales à l'intérieur des populations ayant sélectionné un niveau basal de défenses plus ou moins élevé. Pour tester ces hypothèses il faudrait placer des individus des différentes populations en conditions semblables et voir si la variation est maintenue dans les générations suivantes.

L'existence de variations génétiques, résultat de la sélection naturelle, est aussi liée aux contraintes proximales des défenses immunitaires. En effet le coût des défenses immunitaires entraîne un nécessaire compromis entre l'investissement immunitaire et les autres traits, qui se traduit à l'échelle d'un organisme par une régulation négative des défenses lorsque l'investissement dans un autre trait augmente, et inversement. Ceci conduit à une variété de stratégies possibles de répartition des ressources, cibles de la sélection naturelle. Par exemple une forte pression parasitaire favorisera les génotypes qui permettent un investissement immunitaire élevé mais qui, parallèlement, investissent moins dans les autres traits d'histoire de vie. Ce processus est à la base du « coût évolutif » des défenses immunitaires, qui se manifeste par l'existence de corrélations génétiques négatives (Schmid-Hempel, 2005). Les coûts physiologiques du système immunitaire se traduisent ainsi à différentes échelles, celle de l'individu et celle de la population.

Au sein d'une colonie d'insectes sociaux, les ouvrières peuvent remplir des fonctions très différentes, avec des risques variables d'infection. Quelques travaux, essentiellement chez les abeilles (Page & Robinson, 1991) suggèrent que la division du travail aurait une composante génétique. Par exemple, les groupes comportementaux pourraient correspondre à des lignées paternelles ou maternelles différentes. L'héritabilité des défenses immunitaires étant élevée (Fellowes et al., 1998; Cotter & Wilson, 2002; Schwarzenbach & Ward, 2006), les pressions parasitaires associées aux fonctions des ouvrières pourraient sélectionner des niveaux de défenses immunitaires différents en fonction du génotype. Dans ce cas les variations intra-coloniales observées entre différents groupes comportementaux seraient en partie imputables à des effets génétiques. Le genre *Cataglyphis* offre des opportunités d'étude des effets génétiques sur les défenses : l'analyse de l'effet des lignées paternelles est en cours chez *Cataglyphis cursor* qui est polyandre, et les lignées maternelles pourraient aussi être comparées chez *Cataglyphis velox* qui est polygyne.

4. Les défenses immunitaires, une tâche coloniale intégrée à la division du travail ?

Chez les insectes sociaux, l'évolution des défenses immunitaires est influencée par le fait que la valeur sélective est réalisée à l'échelle de la colonie.

4.1. Réalisation des compromis à l'échelle de la colonie

Les mécanismes d'allocation des ressources pourraient se manifester de manière différente chez les insectes sociaux à cause de la division du travail. En effet, certains individus peuvent être plus nourris que d'autres et donc bénéficier de ressources plus importantes. De plus les dépenses énergétiques normalement assumées par tous les individus solitaires (collecte de nourriture, nourrissage des jeunes, protection contre les prédateurs....) peuvent être répartis de manière flexible entre les membres de la colonie. L'existence d'ouvrières inactives, qui fait l'objet d'une partie de notre travail, rentre dans ce cadre. Nous avons fait l'hypothèse que ces ouvrières disposeraient de plus de ressources à investir dans les défenses immunitaires (Partie II). Cela n'a pas été vérifié par nos expériences mais mériterait d'être exploré. Nous avons développé cette problématique en relation avec la division des tâches entre les ouvrières, mais elle offre également des pistes de recherche intéressantes concernant le partage de la reproduction. En effet, les femelles reproductrices acquièrent probablement plus de ressources que les ouvrières stériles, et elles pourraient de plus utiliser ces ressources différemment, en travaillant moins au profit d'un investissement accru dans les défenses immunitaires. Des travaux sont actuellement conduits au laboratoire sur le lien entre l'investissement immunitaire et l'effort reproducteur chez *Cataglyphis cursor*.

4.2. Intérêt d'une variabilité intra-coloniale ?

Notre étude chez *Cataglyphis velox* a montré que les fourrageuses présentaient des défenses immunitaires plus élevées que les ouvrières internes (Partie II), ce que nous avons interprété comme un mécanisme limitant la contamination du nid (Figure 9). L'avantage d'une telle hétérogénéité intra-coloniale dans les défenses immunitaires pourrait dépendre de l'environnement parasitaire. Par exemple si les parasites dominants dans l'environnement ont un faible taux de transmission, il est utile que les individus exposés soient résistants, mais l'enjeu est moins important pour les autres. En revanche, un niveau basal d'immunocompétence peut être nécessaire en cas d'exposition à des pathogènes présentant

un taux élevé de transmission, afin de limiter la contamination de la colonie en cas d'infestation. De manière générale, il est possible que la stratégie d'investissement immunitaire des individus au sein du groupe varie avec l'environnement parasitaire, ainsi qu'avec les caractéristiques de la société.

Il existe également une grande variabilité dans les défenses immunitaires entre les ouvrières internes, pourtant soumises au même environnement parasitaire. Il se pose alors la question de l'impact de cette hétérogénéité sur la résistance du groupe. Les travaux chez les termites suggèrent que la présence d'individus possédant des défenses immunitaires élevées est favorable à la survie des autres individus (Rosengaus et al., 2000; Rosengaus & Traniello, 2001). On peut alors se demander si l'existence d'une hétérogénéité est avantageuse en elle-même ou bien si, compte tenu des ressources variables que les individus disposent pour l'investissement immunitaire, le fait que certains puissent développer des défenses élevées est favorable à la colonie. Il serait donc intéressant de comparer la résistance entre des groupes homogènes et des groupes hétérogènes dans les défenses immunitaires, avec un même investissement moyen. On pourrait aussi analyser la résistance d'une colonie à une infection parasitaire en fonction de la distribution de taille des ouvrières. Ceci pourrait être mené par des modèles épidémiologiques et des études expérimentales.

Enfin, la division du travail implique différents types d'interactions sociales : contacts antennaires assurant une communication, trophallaxie (échange de nourriture), nettoyage réciproque permettant l'échange de composés cuticulaires et la collecte d'information diverses... Les réseaux d'interactions sociale sont probablement d'une grande importance pour la propagation des pathogènes au sein de la colonie. Or leur structure est peu connue. Nous ne savons pas, par exemple, si tous les individus ont un rôle équivalent dans les interactions sociales ou si certains occupent une position centrale. Une étude approfondie à l'échelle individuelle permettrait d'analyser la variation entre les ouvrières dans le nombre de partenaires et la fréquence des interactions. Si une hétérogénéité existe, il serait intéressant de tester si elle est liée à l'investissement immunitaire.

Bibliographie

- Adamo, S. A., 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Anim. Behav.* **68**: 1443-1449.
- Adamo, S. A., Jensen, M. & Younger, M., 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Anim. Behav.* **62**: 417-425.
- Ahmed, A. M., Baggott, S. L., Maingon, R. & Hurd, H., 2002. The costs of mounting an immune response are reflected in the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Oikos* **97**: 371-377.
- Alexander, R. D., 1974. The evolution of social behaviour. *Ann. rev. Ecol. Syst.* **5**: 324-383.
- Apanius, V., 1998. Stress and immune response. In: *Stress and behavior* (A. P. Møller, M. Milinski & P. J. B. Slater, ed.), Academic Press, San Diego, California, pp. 133-154.
- Armitage, S. A. O. & Siva-Jothy, M. T., 2005. Immune function responds to selection for cuticular colour in *Tenebrio molitor*. *Heredity* **94**: 650-656.
- Armitage, S. A. O., Thompson, J. J. W., Rolff, J. & Siva, J. M. T., 2003. Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *J. Evolution. Biol.* **16**: 1038-1044.
- Arnqvist, G. & Nilsson, T., 2000. The evolution of polyandry: Multiple mating and female fitness in insects. *Anim. Behav.* **60**: 145-164.
- Baer, B., Krug, A., Boomsma, J. J. & Hughes, C. R., 2005. Examination of the immune response of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. *Ins. Soc.* **52**: 298-303.
- Baer, B. & Schmid-Hempel, P., 1999. Experimental variation in polyandry affects parasite load and fitness in a bumble bee. *Nature* **397**: 151-154.
- Barnes, A. I. & Siva-Jothy, M. T., 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): Cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* **267**: 177-182.
- Bourke, A. F. G. & Franks, N. R., 1995. *Social evolution in ants*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Brey, P. T., Lee, W., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., François, M. & Ashida, M., 1993. Role of the integument in insect immunity: Epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6275-6279.
- Calleri, D. V., Rosengaus, R. B. & Traniello, J. F. A., 2007. Immunity and reproduction during colony foundation in the dampwood termite, *Zootermopsis angusticollis*. *Physiol. Entomol.*
- Cerdá, X. & Retana, J., 1997. Links between worker polymorphism and thermal biology in a thermophilic ant species. *Oikos* **78**: 467-474.
- Christe, P., Oppliger, A., Bancala, F., Castella, G. & Chapuisat, M., 2003. Evidence for collective medication in ants. *Ecol. Lett.* **6**: 19-22.
- Cole, B., 1986. The social Behaviour of *Leptothorax allardycei* (Hymenoptera, formicidae): time budgets and the evolution of worker reproduction. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **18**: 165-173.
- Coté, I. M. & Poulin, R., 1995. Parasitism and group-size in social animals - a metaanalysis. *Behav. Ecol.* **6**: 159-165.
- Cotter, S. C., Kruuk, L. E. B. & Wilson, K., 2004. Costs of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune system. *J. Evolution. Biol.* **17**: 421-429.

- Cotter, S. C. & Wilson, K., 2002. Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. *Heredity* **88**: 229-234.
- Deerenberg, C., Arpanius, V., Daan, S. & Bos, N., 1997. Reproductive effort decrease antibody responsiveness. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**: 1021-1029.
- DeVeale, B., Brummel, T. & Seroude, L., 2004. Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell* **3**: 195-208.
- Doums, C., Moret, Y., Benelli, E. & Schmid Hempel, P., 2002. Senescence of immune defence in *Bombus* workers. *Ecol. Entomol.* **27**: 138-144.
- Doums, C. & Schmid-Hempel, P., 2000. Immunocompetence in workers of a social insect, *Bombus terrestris* L., in relation to foraging activity and parasitic infection. *Can. J. Zool.* **78**: 1060-1066.
- Emlen, S. T., 1995. An evolutionary theory of the family. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8092-8099.
- Evans, J. D. & Pettis, J. S., 2005. Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. *Evolution* **59**: 2270-2274.
- Fellowes, M. D. E., Kraaijeveld, A. R. & Godfray, H. C. J., 1998. Trade-off associated with selection for increased ability to resist parasitoid attack in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* **265**: 1553-1558.
- Festa-Bianchet, M., 1989. Individual differences, parasites, and the costs of reproduction for bighorn ewes (*Ovis canadensis*). *J. Anim. Ecol.* **58**: 785-795.
- Folstad, I. & Karter, A. J., 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *Am. Nat.* **139**: 603-622.
- Gobin, B., Heinze, J., Strätz, M. & Roces, F., 2003. The energetic cost of reproductive conflicts in the ant *Pachycondyla obscuricornis*. *J. Ins. Physiol.* **49**: 747-752.
- Hamilton, W. D. & Zuk, M., 1982. Heritable true fitness and bright birds - a role for parasites. *Science* **218**: 384-387.
- Hart, A. G. & Ratnieks, F. L. W., 2001. Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **49**: 387-392.
- Hoffmann, J. A., 1995. Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 4-10.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O., 1990. *The Ants*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, Massachusetts.
- Hughes, W. O. H., Eilenberg, J. & Boomsma, J. J., 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* **7**: 1811-1819.
- Jacot, A., Scheuber, H., Kurtz, J. & Brinkhof, M. W. G., 2005. Juvenile immune system activation induces a costly upregulation of adult immunity in field crickets *Gryllus campestris*. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* **272**: 63-69.
- Joop, G. & Rolff, J., 2004. Plasticity of immune function and condition under risk of predation and parasitism. *Evol. Ecol. R.* **6**: 1051-1062.
- Keller, L., 1995. Parasites, worker polymorphism, and queen number in social insects. *Am. Nat.* **145**: 843-847.
- Keller, L. & Vargo, E. L., 1993. Reproductive structure and reproductive roles in colonies of eusocial insects. In: *Queen Number and Sociality in Insects* (L. Keller, ed.), Oxford University Press, Oxford, pp.
- Koella, J. C. & Boete, C., 2002. A genetic correlation between age at pupation and melanization immune response of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Evolution* **56**: 1074-1079.
- König, C. & Schmid-Hempel, P., 1995. Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* **260**: 225-227.

- Kurtz, J. & Armitage, S. A. O., 2006. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol.* **27**: 493-496.
- Kurtz, J., Wiesnerb, A., Götz, P. & Sauera, K. P., 2000. Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). *Dev. Comp. Immunol.* **24**: 1-12.
- Lenoir, A., 1987. Factors determining polyethism in social insects. *Experientia* **54**: 219-241 (Suppl.).
- Little, T. J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K. & Read, A. F., 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr. Biol.* **13**: 489-492.
- Lochmiller, R. L., 1996. Immunocompetence and animal population regulation. *Oikos* **76**: 594-602.
- Lochmiller, R. L. & Deerenberg, C., 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**: 87-98.
- Loehle, C., 1995. Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations. *Ecology* **76**: 326-335.
- McKean, K. A. & Nunney, L., 2001. Increased sexual activity reduces male immune function in *Drosophila melanogaster*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 7904-7909.
- Mock, D. W. & Parker, G. A., 1997. *The evolution of sibling Rivalry*. Oxford University Press, Oxford.
- Moller, A. P., Dufva, R. & Allander, K., 1993. Parasites and the evolution of host social behavior. *Adv. St. Behav.* **22**: 65-101.
- Moller, A. P., Merino, S., Brown, C. R. & Robertson, R. J., 2001. Immune Defense and Host Sociality: A comparative Study of Swallows and Martins. *Am. Nat.* **158**: 136-145.
- Moret, Y., 2003. Explaining variable costs of the immune response: Selection for specific versus non-specific immunity and facultative life history change. *Oikos* **102**: 213-216.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P., 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* **290**: 1166-1168.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P., 2001. Immune defence in bumble-bee offspring. *Nature* **414**: 506.
- Nelson, R. J., Demas, G. E. & Klein, S. L., 1998. Photoperiodic mediation of seasonal breeding and immune function in rodents: a multifactorial approach. *Am. Zool.* **38**: 226-237.
- Nigam, Y., Maudlin, I., Welburn, S. & Ratcliffe, N. A., 1997. Detection of phenoloxidase activity in the hemolymph of tsetse flies, refractory and susceptible to infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *J. Inv. Pathol.* **69**: 279-281.
- Nunn, C. L., Gittleman, J. L. & Antonovics, J., 2000. Promiscuity and the primate immune system. *Science* **290**: 1168-1170.
- Ottaviani, E. & Franceschi, C., 1996. The neuroimmunology of stress from Invertebrates to man. *Prog. Neurobiol.* **48**: 421-440.
- Page, R. E. & Robinson, G. E., 1991. The genetics of division of labour in honey bee colonies. *Adv. Insect Physiol.* **23**: 117-169.
- Peeters, C., 1997. Morphologically 'primitive' ants: comparative review of social characters, and the importance of queen-worker dimorphism. In: *Social Behavior in Insects and Arachnids* (J. C. Choe & B. J. Crespi, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 372-391.
- Plaistow, S. J., Outreman, Y., Moret, Y. & Rigaud, T., 2003. Variation in the risk of being wounded: an overlooked factor in studies of invertebrate immune function? *Ecol. Lett.* **6**: 489-494.

- Poulsen, M., Bot, A. N. M., Nielsen, M. G. & Boomsma, J. J., 2002. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **52**: 151-157.
- Räberg, L., Grahn, M., Hasselquist, D. & Svensson, E., 1998. On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* **265**: 1637-1641.
- Räberg, L., Vestberg, M., Hasselquist, D., Homdahl, R., Svensson, E. & Nilsson, J. A., 2002. Basal metabolic rate and the evolution of the adaptive immune system. *Proc. R. Soc. Lond. B* **269**: 817-821.
- Rantala, M. J. & Roff, D. A., 2005. An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Funct. Ecol.* **19**: 323-330.
- Ratnieks, F. & Reeve, H., 1992. Conflicts in single-queen Hymenopteran societies: the structure of conflict and processes that reduce conflict in advanced eusocial species. *J. Theor. Biol.* **158**: 33-65.
- Reeson, A. F., Wilson, K., Gunn, A., Hails, R. S. & Goulson, D., 1998. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* **265**: 1787-1791.
- Robinson, G. E., 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *An. Rev. Entomol.* **37**: 637-665.
- Roff, D. A., 1992. *The evolution of life histories. Theory and Analysis*. Chapman & Hall, New York.
- Rolff, J., 2001. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Can. J. Zool.*
- Rolff, J., Armitage, S. A. O. & Coltman, D. W., 2005. Genetic constraints and sexual dimorphism in immune defense. *Evolution* **59**: 1844-1850.
- Rolff, J. & Siva-Jothy, M. T., 2002. Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 9916-9918.
- Rose, M. R., 1991. *Evolutionary biology of aging*. Oxford university Press, New York.
- Rosengaus, R. B., Lefebvre, M. L. & Traniello, J. F. A., 2000. Inhibition of fungal spore germination by Nasutitermes: Evidence for a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. *J. Chem. Ecol.* **26**: 21-39.
- Rosengaus, R. B. & Traniello, J. F. A., 2001. Disease susceptibility and the adaptive nature of colony demography in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **50**: 546-556.
- Saino, N., Cuervo, J. J., Krivacek, M., De Lope, F. & Moller, A. P., 1997. Experimental manipulation of tail ornament size affects the hematocrit of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *Oecologia* **110**: 186-190.
- Saino, N. & Moller, A. P., 1996. Sexual ornamentation and immunocompetence in the barn swallow. *Behav. Ecol.* **7**: 227-232.
- Schmid-Hempel, P., 1998. *Parasites in social insects*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Schmid-Hempel, P., 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* **270**: 357-366.
- Schmid-Hempel, P., 2005. Evolutionary ecology of insect immune defense. *An. Rev. Entomol.* **50**: 529-551.
- Schmid-Hempel, P. & Ebert, D., 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends Ecol. Evol.* **28**: 27-32.
- Schmid-Hempel, P. & Schmid-Hempel, R., 1984. Life duration and turnover of foragers in the ant *Cataglyphis bicolor* (Hymenoptera, Formicidae). *Ins. Soc.* **31**: 345-360.

- Schmid-Hempel, R. & Schmid-Hempel, P., 1998. Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. *Funct. Ecol.* **12**: 22-30.
- Schwarzenbach, G. A. & Ward, P. I., 2006. Responses to selection on phenoloxidase activity in yellow dung flies. *Evolution* **60**: 1612-1621.
- Sheldon, B. C. & Verhulst, S., 1996. Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 317-321.
- Sherman, P. W., Seeley, T. D. & Reeve, H. K., 1988. Parasites, pathogens, and polyandry in social Hymenoptera. *Am. Nat.* **131**: 602-610.
- Siva-Jothy, M. T., Moret, Y. & Rolff, J., 2005. Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. *Adv. Insect Physiol.* **32**: 1-48.
- Siva-Jothy, M. T. & Thompson, J. J. W., 2002. Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiol. Entomol.* **27**: 206-212.
- Siva-Jothy, M. T., Tsubaki, Y. & Hooper, R. E., 1998. Decreased immune response as a proximate cost of copulation and oviposition in a damselfly. *Physiol. Entomol.* **23**: 274.
- Siva-Jothy, M. T., Tsubaki, Y., Hooper, R. E. & Plaistow, S. J., 2001. Investment in immune function under chronic and acute immune challenge in an insect. *Physiol. Entomol.* **26**: 1-5.
- Solomon, N. G. & French, J. A., 1997. *Cooperative breeding in mammals*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Stacey, P. B. & Koenig, W. D., 1990. *Cooperative breeding in birds. Long-term studies of ecology and behavior*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Stearns, S. C., 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press,
- Tooby, J., 1982. Pathogens, polymorphism, and the evolution of sex. *J. Theor. Biol.* **97**: 557-576.
- Turillazi, S., Perito, B., Pazzagli, L., Pantera, S., Gorfer, S. & Tancredi, M., 2004. Antibacterial activity of larval saliva of the European paper wasp *Polistes dominulus*. *Ins. Soc.* **51**: 339-341.
- Vainio, L., Hakkarainen, H., Rantala, M. J. & Sorvari, J., 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. *Evol. Ecol.* **18**: 75-84.
- Wilson, E. O., 1971. *The Insect Societies*. Belknap Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Wilson, K., Cotter, S. C., Reeson, A. F. & Pell, J. K., 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Lett.* **4**: 637-649.
- Wilson, K., Knell, R., Boots, M. & Koch, O. J., 2003. Group living and investment in immune defence: An interspecific analysis. *J. Anim. Ecol.* **72**: 133-143.
- Wilson, K., Thomas, M. B., Blanford, S., Doggett, M., Simpson, S. J. & Morre, S. L., 2002. Coping with crowds: density-dependant disease resistance in desert locusts. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 5471-5475.
- Winston, M. L., 1987. *The biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Zuk, M. & Stoehr, A. M., 2002. Immune defense and host life history. *Am. Nat.* **160**: S9-S22.

Reproductive conflicts affect labor and immune defense in the queenless ant *Diacamma sp.* from Nilgiri.

Aurélie Bocher,^{*} Claudie Doums[‡], Laurence Millot^{*} & Claire Tirard^{*}

^{*} Laboratoire de Parasitologie Evolutive, CNRS UMR 7103, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

[‡] Laboratoire Fonctionnement et Evolution des Systèmes Ecologiques, CNRS UMR 7625, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

e-mail :

aurelie.bocher@snv.jussieu.fr

claudie.doums@snv.jussieu.fr

claire.tirard@snv.jussieu.fr

laurence.millot@snv.jussieu.fr

Running head: Cost of conflicts on immune defense

Abstract

In many species of social Hymenoptera, totipotency of workers induces potential conflicts over reproduction. However, actual conflicts remain rare despite the existence of a high reproductive skew. One of the current hypotheses assumes that conflicts are costly and thus selected against. We studied the costs of conflicts in 20 colonies of the queenless ant *Diacamma sp.* from Nilgiri by testing the effects of conflicts on labor and worker immunocompetence, two parameters closely linked to worker indirect fitness. In this species, the dominant female is the only mated worker (gamergate) and monopolizes reproduction. We experimentally induced conflicts by splitting each colony into two groups, a control group containing the gamergate and an orphaned group displaying aggressions until a new dominant worker arises. Immunocompetence was assessed by the clearance of *E. coli* bacteria that we injected in ants. Time budget analysis revealed a lower rate of labor and especially brood care in orphaned groups, supporting the existence of a cost of conflicts on labor. Fifteen days after splitting, a lower immunocompetence was also found in orphaned groups, which concerned workers involved and not involved in conflicts. We propose that this immunosuppression induced by conflicts could stem from stress and not directly from aggression.

Keywords : Cost of conflicts, aggressions, immune defense, immunosuppression, labor, regulation of reproduction, queenless ants

Animal societies can be viewed as harmonious and cooperative systems, however conflicts between members of the society can occur. These conflicts result from divergent interests between individuals of the same sex mainly over reproduction. In most vertebrate societies, dominance interactions that can include aggressive behaviors lead to a hierarchy where dominant individuals try to monopolize reproduction (Emlen 1995; Clarke and Faulkes 1997; Mock and Parker 1997). Such conflicts can be found in primitively eusocial insects (Gadagkar 1991; Keller and Vargo 1993; Peeters 1997). In higher eusocial insects, these conflicts are partly solved by the extreme division of reproductive labor with only the queen caste monopolizing reproduction. The worker caste, instead, performs all the other tasks of the colony which includes foraging, brood care and maintenance of the nest. Because of the haplodiploid system of sex determination of Hymenoptera (haploid males are produced by arrhenotokous parthenogenesis whereas diploid females result from fertilized eggs), relatedness asymmetries between colony members generate specific conflicts between queen and workers (Bourke and Franks 1995; Crozier and Pamilo 1996). In particular, conflicts over the production of males by workers or the optimal colony sex-ratio have largely been investigated as they provide elegant tests of the kin selection theory (Bourke and Chan 1999). However in many cases, even though conflicts are predicted, no evidence of manipulation can be detected, indicating that the conflicts are already resolved. For example, workers eggs laying rarely occurs in monogynous colonies, even though this is predicted by kin selection theory (Ratnieks 1988).

Several sets of hypotheses suggest why actual conflicts are often absent in situations where potential conflicts are predicted. One of the leading hypotheses proposes that conflicts are costly and thus pacific solutions are selected for (Ratnieks and Reeve 1992; Bourke and Franks 1995). For example, the cost of worker reproduction (West-Eberhard 1975; Cole 1986) could favor the spread of self-restraint or worker policing alleles in populations, resulting in the increase of social harmony (Ratnieks 1988). Besides, direct aggressions between colony members appear to be very rare in insect societies, which indirectly suggests that they should be associated with high costs. Fighting behaviors are described between queens after pleometric foundation (Röseler 1991; Choe and Perlman 1997), between workers and eventually queen for male production in stingless bees (Peters et al. 1999) or between workers for dominance and reproductive status in some formicoxenine and queenless ponerine ants (Heinze et al. 1994; Monnin and Peeters 1999). In the queenless ponerine ants, the queen caste does not exist and workers have retained the ability to reproduce leading to basic conflicts over reproduction. In the monogynous queenless species, with a single mated

reproductive worker (called gamergate), aggressions are just used for the establishment of the gamergate in orphaned colonies. Thereafter, workers restrain their reproduction as long as the gamergate keeps a correct level of oogenesis which can be detected by a fertility signal based on cuticular hydrocarbons (Monnin et al. 1998; Cuvillier et al. 2004a; Cuvillier et al. 2004b). This switch from aggressive to chemical regulation of reproduction strongly suggests that aggressions are costly.

Even though costs of conflicts are often assumed to be of major importance for understanding the evolution of conflicts how they are solved, few studies have estimated such costs. An energetic cost of worker aggressions was observed in orphaned colonies of *Pachycondyla obscuricornis*, through a higher metabolic rate measured by the total CO₂ emission of the colony (Gobin et al. 2003). As the time budget of a worker is limited, workers involved in aggressive behaviors could also invest less time in labor, which would decrease colony efficiency. Such decrease of work load in aggressive workers has been observed in different species (Cole 1986; Schmid-Hempel 1998; Monnin and Peeters 1999; Monnin and Ratnieks 1999). Direct costs on the quality of individuals have still remained unexplored. In this study we proposed to address this question by investigating potential costs of conflicts on immune defense. Although this approach is new, immune defense could be an interesting trait to consider for two reasons. First, the level of immune defense is known to affect the probability of getting infected by a pathogen (Adamo 2004) and should therefore be linked to worker survival and colony productivity, all the more in social insects, for which living in groups composed of closely related individuals facilitates disease transmission. Second, it is now generally assumed by ecological immunologists that immune defense are costly, and integrating immunity as a life-history trait has already revealed useful in understanding the evolution of life-history strategies in insects (Lochmiller and Deerenberg 2000; Rolff and Siva-Jothy 2003; Schmid-Hempel 2005).

The invertebrate immune system is based on both cellular and humoral components, and infection stimulates a range of diverse defensive responses (Gillespie et al. 1997). Haemocytes attach to invading organisms and then isolate them by phagocytosis or by forming around them an organized multi-cellular capsule. These responses are often associated with proteolytic activation of the phenoloxydase zymogene, present in the haemolymph. An other component of insect immune response to pathogens is the synthesis by fat body and haemocytes of a variety of antimicrobial proteins and peptides, which are secreted in the haemolymph. Insect immunity thus relies on complex interactions between

humoral and cellular components, which should be considered when trying to assess the relative strength of the immune system (Adamo 2004).

In the present study, we investigated costs of aggressive reproductive conflicts in a queenless monogynous species *Diacamma sp.* from Nilgiri, both on working efficiency and on quality of individuals, assessed by their level of immune defense. We studied an immune response that involves several components, by measuring the clearance of *E. coli* bacteria that we injected in ants. In order to assess the cost of conflicts, aggressive interactions were induced by splitting each colony into two groups, a control group (with gamergate) and an orphaned group (without gamergate). Behavioral studies allowed us to test for an effect of conflicts on work load in orphaned groups. The existence of a cost of conflicts on immune defense and its origin within orphaned groups were also investigated. Two kinds of costs can be present. First, conflicts may induce a stress response on all individuals of the orphaned groups, which could negatively affect immune defense as observed in many species (Lackie 1988; Apanius 1998). A lower immune response should thus be expected in most workers of orphaned groups. Second, aggression by itself could represent a cost. In such case, a decrease of immune defense in orphaned groups would affect especially individuals involved in aggressive interactions.

Materials and methods

Studied Species

We conducted the study on an indian population of *Diacamma* which is highly related to *Diacamma ceylonense* and found in Nilgiri Hills in south India (referred to as 'nilgiri' in Baudry et al. 2003). All the species of the genus *Diacamma* are queenless, and have one singly mated worker called gamergate. A peculiar behavior reduces the conflicts over reproduction in all species, except in *Diacamma sp.* from Nilgiri (Cournault and Peeters 2006; Peeters et al. 1992). This behavior consists in biting off a pair of thoracic appendages (called gemmae) of all emerging workers (Fukumoto et al. 1989; Peeters and Higashi 1989; Peeters and Billen 1991). By doing so, the gamergate prevents them from mating and reproducing sexually (Peeters and Higashi 1989), therefore removing any potential conflict over the reproduction of females. Interestingly, in *Diacamma sp.* from Nilgiri, in which mutilation does not occur, the regulation of reproduction is similar to the one found in many monogynous queenless species. In an orphaned colony, aggressive interactions are used to determine a hierarchy and the future gamergate. In *Diacamma sp.* from Nilgiri, these aggressions can include antennal boxing, morsures, immobilizations (several workers holding another worker for hours), thoracic attacks (repeated attacks on gemmes) and sting smearing (Peeters et al. 1992, Cournault and Peeters, personal communication). Cuvillier et al. (2004a) demonstrated, in a different queenless species, that once the gamergate is established, aggressions are replaced by chemical fertility signalling. Aggressive interactions can therefore be observed after the death of a gamergate or after colony fission. Even though the details of this mode of colony foundation are not known, it implies that after fission one of the groups of workers will not have a gamergate, and might thus show aggressive behaviors.

Ants collection and rearing

Twenty colonies of *Diacamma sp.* from Nilgiri were collected in February and November 2004 near Gundlupet, Tamil Nadu (mean initial colony size \pm SE: 278.9 ± 15.0). Colonies were reared in the laboratory in plaster nests at 25°C with 12h light -12h dark cycle and fed at libitum on *Tenebrio molitor* pupae and crickets. Workers are monomorphic, with a body size of about 1.5 cm and very few size variation. All ants were individually marked with

spots of coloured paint, and each colony was observed before the start of the experiment in order to identify the gamergate, the foragers and the nurses.

Experimental groups

To induce social conflicts, we splitted each initial colony into two groups: the control group containing the gamergate, and the orphaned group, without the gamergate. We allocated randomly the workers to the two groups, while ensuring that they were identical in size and composition with respect to the proportion of foragers and nurses. The brood was also equitably shared. This process corresponds to the start of the experiment (day zero). Aggressive behaviors are known to occur in orphaned groups whereas they are absent in presence of the gamergate (Peeters et al. 1992). The size of these groups varied among colonies from 52 to 80 ants (mean group size \pm SE = 70.2 ± 2.2 ; see Table 1). If the size of the initial colony exceeded 160 individuals, a maximum of 80 ants was used in each group.

Behavioral observations

After splitting, we estimated the intensity of aggressions in orphaned groups by counting the number of aggressive interactions during a continuous 30-min observation period twice a day until the end of the experiment. Antennal boxing and sting smearing were rarely observed. Aggressiveness generally increased on the first or second day after colony-splitting, and lasted for about eight days. Furthermore, for 14 colonies, scans of the orphaned and control groups were performed twice a day during the first 8 days of the experiment. Each scan consisted in recording the behavior performed by each individual. Ants were considered resting when they remained totally motionless or when they moved only antennas. We also recorded working behaviors, comprising brood care, foraging and nest maintenance. As the time spent in nest maintenance is low, we included it with foraging in “working behaviors others than brood care” which corresponds to nest provisioning and maintenance. Other behaviors were also recorded, including social interactions, grooming, moving around the nest and eating, but were not individually considered in the analysis.

Immunological measurements

We tested the effect of conflicts on immunocompetence at two different times: eight days after splitting, when the aggressions were at the highest level and only started to decrease in most colonies, and 15 days after splitting, when very few or no aggression were observed. The immunocompetence measurement was performed 8 days after splitting for 5 colonies, 15 days after splitting for 7 colonies, and both 8 days and 15 days after splitting (on different individuals) for 8 colonies (see Table 1). The immune response was evaluated by measuring the resistance to bacterial infection (see below). In order to perform the test the same day in the orphaned and control groups of a given colony, the immune response was measured on a maximum of 40 ants in each group. To ensure a representative distribution of ants according to the level of aggressions they received, ants were categorized by the number of aggressions received (0, 1-4, 5-9, 10-19, 20-49, 50-100, >100) and the proportion of each class was reproduced in the subsample.

The antibacterial response was measured as the persistence of a bacterial infection with *Escherichia coli* strain CIP 103470 (Pasteur Institute Collection, Paris), after injection in haemolymph, as described in Gorman and Paskewitz (Gorman and Paskewitz 2000). The resistance of an animal to a pathogen depends on different parameters, including the existence of behavioral adaptations, the level of genetic variation in factors that determine pathogen intrusion and recognition, and the efficiency of the immune response, which corresponds to immunocompetence. Indeed, a variation of resistance to a pathogen between individuals is not always related to differences in the capacity of the immune system, and caution may be required when interpreting the results (Apanius 1998). In our experiment, defense mechanisms other than immune system should not interfere: first, the behavioral and cuticular lines of defense are not involved in resistance since the pathogen is directly introduced in the haemolymph. Second, it is unlikely that *E. coli* and ants have coevolved since *E. coli* is a general and ubiquitous pathogen. Third, ants from a given colony are very close genetically, thus the problem of genetic variation of resistance based on individual differences in pathogen recognition should not be important.

Bacteria solutions were prepared by diluting an overnight culture in a LB culture medium to a concentration of 300 bacteria/ μ l. Bacteria were counted using a Neubauer haemocytometer. Ants from orphaned and control groups from a given colony were injected the same day with the same bacterial solution. Prior to injection we cold-anesthetized ants and cleaned the sternites with 70% ethanol. 1 μ l of the bacterial solution was then injected

ventrally through the intersegmental membrane between the 3rd and 4th abdominal segments using a 10 μ l syringe connected with a flexible capillary to a 0.3mm–diameter dental needle. Injected ants from each group were kept together in a plastic box with water supply, separately from the rest of the colony. Ten hours later, most ants had survived (97.7%), and the haemolymph was sampled using a disposable graduated capillary tube through a hole performed in the abdomen. From 0.3 to 1.5 μ l of haemolymph was sampled from each ant (this manipulation is lethal) and diluted 100 fold in LB culture medium. From this solution, 30 μ l were spread on LB agar plates containing tetracycline at a concentration of 10 μ g/ml (the *E. coli* strain used is resistant to tetracyclin). The plates were incubated overnight and then scored for the number of *E. coli* colonies. The level of the immune response of each ant was then characterized by the bacterial count, a low bacterial count indicating a high immune response and inversely. Ants that died during immunological manipulation or for which no haemolymph could be sampled were excluded from analysis (in total 3.4% of manipulated ants). The concentration of bacteria injected and the time between injection and haemolymph sampling were chosen to allow a high survival of the ants but providing a sufficiently large variation in the number of bacteria between individuals.

Data analysis

For each colony, the level of aggressiveness in control and orphaned groups was compared using a Mann-Whitney test on the mean number of aggressions per individual. To test for the effect of conflicts on behavior and immune defense, analyses were carried out using mixed models, with treatment (control/orphaned) as fixed factor and colony and interaction treatment by colony as random factors. For behavioral data, the dependant variable was the ratio of the number of scans for which the individual was observed performing a given behavior divided by the total number of scans, and the binomial distribution was used (lmer function in R 2.4 for Windows). For immune defense data, the bacterial count (number of bacteria in 30 μ l of 100 fold-diluted-haemolymph) was the dependant variable, following a negative binomial distribution (glmmADMB function in R 2.4 for Windows). Effects were tested by comparing two models, one having the term of interest removed, using the likelihood (L) ratio test (LRT). To compare a model1 and a model2, the LRT statistic was calculated as $2 [\log(L2)-\log(L1)]$ and follows a χ^2 distribution. The degree of freedom was

the difference in the numbers of parameters between the models. In all tests the interaction terms were removed when not significant.

Concerning immune defense data, given that we plated always the same volume of haemolymph, the number of bacteria counted reflects the concentration of bacteria in haemolymph. For such a measure it would be relevant to control for the global level of hydration of ants. These data are not available but we included in the models the volume of haemolymph that we were able to remove from ants as it might positively correlate to the total volume of haemolymph present in the body. Moreover, the colonies tested 15 days after splitting included eight colonies for which at least half of the workers were removed eight days after splitting (see Table 1). To control for a possible disturbance induced by the reduction of the colony size, the interaction treatment by size reduction was initially included in the model (see below).

In order to test for a direct cost of aggressions on immune defense, we performed an analysis within orphaned groups using a mixed model with the bacterial count as dependant variable. As above, we used a negative binomial distribution for the bacterial counts. The independent variables were the volume of haemolymph removed from ants and the number of aggressions received or given by ants and the colony as random factor. The effect of the interaction number of aggressions by colony was not considered because our data are not appropriate to test such an effect since the range of aggressions experienced by ants largely differed among orphaned groups.

Results

Aggressions and time activity budgets

The number and pattern of aggressions varied strongly among the orphaned groups (see Table 1), but for each colony, aggressiveness was significantly higher in orphaned than in control group (Mann-Whitney analysis on the mean number of aggressions per individual, all $P < 0.05$). Splitting the colonies into two groups was thus a successful way to induce aggressions in the orphaned groups as predicted. Colonies for which immunocompetence was only measured 8 days after splitting were observed for 8 days, whereas others were observed for 15 days. However this should not have highly influenced the total of aggressions counted since most aggressions occurred during the first 8 days. Indeed the total number of aggressions counted in orphaned groups for colonies observed for 8 days (total \pm SE: 709.4 ± 129.4 , $n = 5$) was even higher than for colonies observed for 15 days (total \pm SE: 562.1 ± 105.1 , $n = 15$).

In the models analysing behavioral data, the effect of the interaction treatment by colony (considered as a random effect) was never significant, and was therefore removed. Individuals spent less time working in orphaned groups than in control groups (17.7% of reduction in total labor, $\chi^2_1 = 8.30$, $P = 0.0039$; see Table 2 and Fig. 1C). More precisely, brood care was significantly affected (23.7% of reduction, $\chi^2_1 = 6.03$, $P = 0.0145$) whereas the decrease in nest maintenance and foraging was not significant (11.2% of reduction, $\chi^2_1 = 1.50$, $P = 0.221$). No difference in resting rate was found between control and orphaned groups ($\chi^2_1 = 0.02$, $P = 0.88$).

The time spent in aggressive behaviors was quite low (5.9%), and therefore not sufficient to explain the lower working activity in orphaned groups. This was checked by calculating the frequency of each behavior by each individual after having removed the scans involving an aggressive act. As expected, the same qualitative results were found (data not shown), indicating that the difference in workers time budget between the two groups can not simply be explained by the occurrence of aggressive acts in orphaned groups. The social conflicts in orphaned groups therefore induced disturbance that decreased the working effort.

Effects of conflicts on immune response

Data on antibacterial response were collected for a total of 1920 ants from 20 colonies. The level of immune response of each ant was characterized by the bacterial count 10 hours after injection, a low bacterial count indicating a high immune response and inversely. The results suggested a lower bacterial count in orphaned groups eight days after splitting, although the effect is only marginally significant ($P = 0.042$, $n = 999$). At the opposite a significantly higher bacterial count in orphaned groups was detected 15 days after splitting (69.6% of increase in bacterial count, $P = 0.008$, $n = 921$, main statistical results are reported in Table 3; see also Fig. 2). This indicated a lower resistance to infection for groups displaying conflicts. The volume of haemolymph removed from ants had no significant effect on the bacterial count (see Table 3). The interaction treatment by group size-reduction was neither significant ($\chi^2_1 = 1.68$, $P = 0.19$) which showed that the possible disturbance induced by the removal of 40 individuals eight days after splitting did not influence the effect of treatment at 15 days. The importance of the colony effect can be assessed by the variance component associated with this random factor (variance parameter \pm SD, 8 days: 1.30 ± 0.54 ; 15 days: 0.76 ± 0.29). In our models the confidence intervals of this parameter do not overlap 0 (95% confidence interval, 8 days: [0.41 - 2.19]; 15 days: [0.28, 1.24]), suggesting that the variance associated with the colony is significantly higher than 0 both at 8 and 15 days. This is not surprising since individuals from the same colony share a common environment as well as 75% of their genotype (in a monogynous and monoandrous colony).

If aggressions per se were directly responsible of the decrease of immune response in orphaned groups, a positive relation between the level of aggressions and the level of decrease of immune response in orphaned groups should be expected.

However the difference in bacterial count between the two treatments within colonies was not dependent on the total number of aggressions in orphaned groups, neither eight days after splitting (linear regression: $F_{1,11} = 0.74$, $P = 0.41$) nor 15 days after splitting ($F_{1,13} = 0.51$, $P = 0.49$).

In the same line of reasoning, we also tested whether all ants from orphaned groups were equally affected by conflicts, or whether only those really involved in conflicts suffer specific costs. To do so, we performed the same analysis as for complete groups (with a mixed model, using negative binomial distribution), keeping in orphaned groups either the ants not suffering aggressions or the ants directly suffering aggressions. Any worker was

likely to receive 1 or 2 aggressions accidentally and thus we considered only ants that received at least 3 aggressions in this latter group. Eight days after splitting the treatment was not significant for ants not suffering aggressions ($\chi_1^2 = 1.16, P = 0.281, n = 799$), and close to the significance for the ants suffering aggressions ($\chi_1^2 = 3.78, P = 0.052, n = 703$). Fifteen days after splitting, the effect of treatment was significant both when considering ants not receiving aggressions ($\chi_1^2 = 5.8, P = 0.016, n = 744$), and ants suffering aggressions ($\chi_1^2 = 4.82, P = 0.028, n = 635$) with again a higher bacterial count in orphaned than in control groups. Therefore the cost of conflicts on immunocompetence does not appear to be due to a direct effect of aggressive interactions. Note that similar results were found whatever the number of aggressions considered as a threshold.

Individuals that gave and received aggressions might not be the same making pertinent to conduct the same analysis considering also the number of aggressions given. There was a positive correlation between the number of aggressions received and given, both 8 days after splitting ($r^2 = 0.13, P < 0.0001$) and 15 days after splitting ($r^2 = 0.15, P < 0.0001$). Not surprisingly, the analyses based on the number of aggressions given gave qualitatively similar results as the ones based on aggressions received (see above). There was no effect of treatment 8 days after splitting (considering non-aggressive ants: $\chi_1^2 = 1.58, P = 0.075, n = 808$; considering aggressive ants: $\chi_1^2 = 1.78, P = 0.18, n = 694$) whereas 15 days after splitting workers from orphaned groups had a higher bacterial count (considering non-aggressive ants: $\chi_1^2 = 7.5, P = 0.0062, n = 776$; considering aggressive ants: $\chi_1^2 = 3.04, P = 0.081, n = 603$).

Within orphaned groups, there was no significant correlation between the number of aggressions and the bacterial count neither 8 days after splitting (aggressions received: $\chi_1^2 = 0.66, P = 0.42$; aggressions given: $\chi_1^2 = 0.80, P = 0.37$), nor 15 days after splitting (aggressions received $\chi_1^2 = 2.04, P = 0.153$; aggressions given $\chi_1^2 = 3.3, P = 0.069$).

Discussion

Aggressions and time activity budgets

The splitting of colonies was followed by a period of conflicts in orphaned groups. The number of aggressions in these groups was highly variable, which confirmed previous observations made on this species (Peeters et al. 1992; Cournault and Peeters 2006). The age distribution of individuals within the orphaned groups is probably a major factor determining the intensity of reproductive conflicts since young individuals are more prone to seek access to reproduction.

Workers in orphaned groups spent less time working. The difference was quite low for maintenance and foraging, in accordance with a study on the social wasp *Polistes dominulus* where foraging was not affected by conflicts following queen removal (Strassmann et al. 2004). However, the reduction was more important for brood care. Since, at a given time in a colony, a large percentage (around 30%) of workers are resting they may represent a reserve that could be mobilized if necessary. We could have then expected a lower percentage of inactive workers in orphaned groups. However, our results did not confirm such role of reserve since no difference was found in the percentage of inactive workers between groups, even if the time spent in working behaviors was lower in orphaned groups.

Two non exclusive hypotheses can be put forward to explain the decrease in labor, and especially brood care, in orphaned groups. First, dominant individuals could realize a trade-off between working and fighting for time and metabolic reserves. In colonies of *Temnothorax allardycei*, Cole (1986) analyzed the time budget of the three top ranking ants and observed a negative relation between dominance activity and brood care. However, working rate was not related to aggressions in colonies of bumble bees (Foster et al. 2004). Besides, a recent study on hover wasps demonstrated that helpers adjust their working effort according to the probability of attaining breeding status themselves (Field et al. 2006). The authors experimentally removed a high ranking worker and found that subordinates that consequently rose in the hierarchy worked less afterwards. The evolutionary basis of this response should lie in a trade-off between working effort, that increases the indirect component of their fitness, and future direct fecundity and survival. A similar phenomenon could occur in queenless ants, even if the hierarchy is not always well-defined. In our species, removing the gamergate increases the probability for the workers to inherit the nest, and could lead them to invest less in collective labor, at least temporally. A second hypothesis would be

that conflicts between workers competing for reproduction may disturb peaceful workers and prevent them from working (Cole 1986). In accordance with this hypothesis, aggressions occurred most of the time close to the brood area and fighting ants frequently induced movements in nearby quiet ants. Working ants may also waste some time in submission behavior to the dominant individuals patrolling.

Whatever the mechanisms leading to a reduced work load in orphaned groups, the likely consequence of a disturbance of brood care is a delay in brood development or the death of part of the brood (not measured here). This should result in a decrease of colony productivity and represent a cost of conflicts. A cost of conflicts was detected in *Pachycondyla obscuricornis* at the colony level by Gobin et al. (2003). A higher metabolic rate, measured by total CO₂ emission, was observed in orphaned groups displaying conflicts, thus demonstrating an energetic cost. Both ours and their results strongly suggest a cost of conflicts at the colony level that could negatively affect productivity.

Costs of conflicts on immune response

The technique used here to measure the level of immune defense is a test of resistance to a pathogen. However it is often argued that the immune response differs depending on the type of pathogen and that a variation in resistance to infection by a particular pathogen could result from a change in allocation of resources to different elements of the immune system (Adamo 2004). Similarly, a decrease in maintenance of the immune system may remain undetected if it affects a component of the immune system little involved in the resistance to the tested pathogen. As a consequence it would be relevant to associate different measurements of immunity. However, most immune defense measurements require a sample of haemolymph, and applying them to the same individuals is not possible in organisms like ants in which the volume of haemolymph is limited. To circumvent such problem, we used here an immune response, the clearance of a generalist bacteria, that involves several components of the immune system.

Eight days after splitting, a trend to a higher immunocompetence in orphaned groups was detected. The effect of treatment remained close to the significance when, in orphaned groups, only ants suffering aggressions were included, but not when these ants were excluded. This effect could result from a proximate effect of physical harm caused by aggressive interactions. Actually, if the cuticle is damaged, the immune system may be, at least partly, activated (Brey et al. 1993; Plaistow et al. 2003) which could enhance the antibacterial

response measured. Such an effect could also be linked to a prophylactic increase of immune defense to face potential infections that could be associated to cuticule injuries (Barnes and Siva-Jothy 2000; Adamo et al. 2001; Calleri et al. 2007). Anyway, our results clearly showed an absence of immunosuppression in orphaned groups at 8 days.

Fifteen days after splitting, the immune response was lower in workers from orphaned groups. The differences found between orphaned and control groups from a same colony could be partly due to the distribution of worker during splitting, as age and status of workers may influence their immune defense. However as ants were randomly distributed between groups this should not result in the pattern found, which is a lower immunocompetence in most orphaned groups. The intensity of immunosuppression was not related to the level of aggressions in the orphaned groups. For instance, a lower immunocompetence was found in some orphaned groups with a low number of aggressions (e.g. colony 12) and even when workers involved in aggressions (giving or receiving aggressions) were excluded from the analysis.

All these results suggest that aggressions by themselves do not directly account for the cost of conflicts measured in orphaned groups. Instead, we propose that a conflicts-derived stress response mediates the immunosuppression found in most colonies. In *Diacamma sp.* from Nilgiri, conflicts frequently induce avoidance or submission reactions of surrounding workers and could represent a stress factor in orphaned colonies for most of the workers and not only for workers involved in the hierarchy. Moreover, removing the gamergate could itself represent a stressful situation for ants even if the intensity of conflicts remains low. Many studies on social insects have clearly showed that the presence of the reproductive can easily be perceived by workers, either directly by specific pheromones produced by the queen (Sledge et al. 2001; Hannonen et al. 2002) or the gamergate in queenless species (Monnin et al. 1998; Tsuji et al. 1999; Cuvillier-Hot et al. 2004a) or indirectly by the presence of the brood (Endler et al. 2004).

Much is known about stress in vertebrates, with many studies arguing that stress could lead to an immunosuppression (Apanius 1998). In invertebrates, research on stress is relatively recent and few studies have been performed until now, but some experiments performed on molluscs (Lacoste et al. 2001a; Lacoste et al. 2001b) and crustaceans (Le Moullac et al. 1998; Perazzolo et al. 2002; Pascual et al. 2003) strongly suggest that invertebrates also present a typical stress response which basic characteristics are relatively similar to those found in vertebrates (Ottaviani and Franceschi 1996). Moreover in vitro and

in vivo experiments in molluscs have also revealed that a stress response could exert an inhibitory effect on immune function and increase susceptibility to pathogen infection (Stefano and Salzet 1999; Lacoste et al. 2002; Malham et al. 2003). During a stress response, immunity could be temporarily down-regulated to make nutrients available for other organismal processes that have a higher priority (Sheldon and Verhulst 1996). Actually, immune defense have been shown to be costly in many studies on invertebrates (Rolff and Siva-Jothy 2003; Schmid-Hempel 2005) including social insects (Moret and Schmid-Hempel 2000). An alternative hypothesis proposes that, during a stress response, the immune system could be down-regulated to prevent hyperactivation and ensuing autoimmune response, that are more susceptible to occur in a context of high physical workload and production of stress proteins (Raberg et al. 1998).

In our study, the immunosuppression was qualitatively the same whatever the level of aggressions given or received by ants, suggesting that the conflicts were as stressful for dominants as for subordinates. However, our data appeared limited to address such questions since we do not know the level of immune response of the individuals before being involved in conflicts. In social vertebrates, comparative studies have shown that the relative levels of glucocorticoids (indicative of the level of stress) in dominants and subordinates vary among species. Differences in glucocorticoids concentrations between dominants and subordinates were found in some species, but not in consistent way (Clarke and Faulkes 1997; Creel 2001; Goymann and Wingfield 2004; Sands and Creel 2004; Creel 2005; Poisbleau et al. 2005). Concerning immune defense, higher quality of dominant individuals compared to subordinates has been reported in some vertebrates and invertebrates studies (Zuk and Johnsen 2000; Koskimäki et al. 2004; Rantala and Kortet 2004; Hawley et al. 2006). We did not found such relation in *Diacamma sp.* from Nilgiri since the immunocompetence of workers within orphaned groups was not dependant on the number of aggressions they gave or received. Using different measures of immune defense is required to confirm this result since in invertebrate and invertebrates species a higher immune response has been found in dominants for some immune assays but equivalent or even weaker for others (Ahtiainen et al. 2006; Hawley et al. 2007).

In conclusion, our study provides arguments in favour of the existence of a decrease of immune defense in orphaned groups probably linked to the stress response generated by the absence of the reproductive and not to a direct cost of aggressions. In addition, the behavioral study confirmed that conflicts affect worker labor and especially brood care, potentially leading to a decrease in colony productivity. In queenless ants, once dominance relationships

stabilize, conflicts stop and are replaced by a chemical fertility signalling (Monnin et al. 1998; Cuvillier-Hot et al. 2004a; Cuvillier-Hot et al. 2004b). Our results support that this limitation of conflicts to the period of hierarchy formation could have evolved because of their costs. In species where workers are fertile, maintaining dominance interactions in presence of the reproductive female allows a rapid start of worker reproduction if she dies. Such mode of regulation of reproduction would be selected only if the benefits outweighed the costs, which is more likely in species where workers can produce both males and females. Indeed, physical aggressions of workers in the presence of gamergates are common in ponerine ants species in which workers can mate. In *Diacamma sp.* from Nilgiri, the benefits of maintaining a hierarchy appear to be insufficient to balance the costs of conflicts. Even though different studies have applied the principles of ecological immunology to social insects (Traniello et al. 2002; Rolff and Siva-Jothy 2003; Vainio et al. 2004; Evans and Pettis 2005; Schmid-Hempel 2005; Baer et al. 2006), our study is, to our knowledge, the first to have investigated the costs of conflicts on immune defense.

Acknowledgments

We thank S. Baratte for his help in collecting colonies in the field, F. Rineau and JB. Caillau for their contribution to behavioral observations and A. Lenoir, T. Monnin, and C. Peeters for their helpful comments on the manuscript. This study was supported by the French Ministry of Research ‘Action concertée incitative jeunes chercheurs’ (N° 5183)

Literature cited

- Adamo, S. A. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour* 68:1443-1449.
- Adamo, S. A., M. Jensen, and M. Younger. 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Anim Behav* 62:417-425.
- Ahtiainen, J. J., R. V. Alatalo, R. Kortet, and M. J. Rantala. 2006. Immune function, dominance and mating success in drumming amle wolf spiders *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Behav ecol sociobiol* 60:826-832.
- Apanius, V. 1998. Stress and immune response. Pp. 133-154 in A. P. Møller, M. Milinski and P. J. B. Slater, eds. *Stress and behavior*. Academic Press, San Diego, California.
- Baer, B., S. A. O. Armitage, and J. J. Boomsma. 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* 441:872-875.
- Barnes, A. I., and M. T. Siva-Jothy. 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): Cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B*. 267:177-182.
- Baudry, E., C. Peeters, L. Brazier, M. Veuille, and C. Doums. 2003. Shift in the behaviours regulating monogyny is associated with high genetic differentiation in the queenless ant *Diacamma ceylonense*. *Insectes Sociaux* 50:390-397.
- Bourke, A. F. G., and G. L. Chan. 1999. Queen-worker conflict over sexual production and colony maintenance in perennial social insects. *The American Naturalist* 154:417-426.
- Bourke, A. F. G., and N. R. Franks. 1995. *Social evolution in ants*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Brey, P. T., W. Lee, M. Yamakawa, Y. Koizumi, S. Perrot, M. François, and M. Ashida. 1993. Role of the integument in insect immunity: Epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 90:6275-6279.
- Calleri, D. V., R. B. Rosengaus, and J. F. A. Traniello. 2007. Immunity and reproduction during colony foundation in the dampwood termite, *Zootermopsis angusticollis*. *Physiological Entomology*
- Choe, J., and D. Perlman. 1997. Social conflict and cooperation among founding queens in ants (Hymenoptera: Formicidae). Pp. 392-406 in J. Choe and B. Crespi, eds. *The evolution of social behavior in insects and arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Clarke, F. M., and C. G. Faulkes. 1997. Dominance and queen succession in captive colonies of the eusocial naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264:993-1000.
- Cole, B. 1986. The social Behaviour of *Leptothorax allardycei* (Hymenoptera, formicidae): time budgets and the evolution of worker reproduction. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 18:165-173.
- Cournault, L., and C. Peeters. 2006. Aggressive regulation of monogyny in non-mutilating *Diacamma* ants. *Behav Ecol in press*
- Creel, S. 2001. Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology and Evolution* 16:491-497.
- Creel, S. 2005. Dominance, aggression, and glucocorticoid levels in social carnivores. *Journal of Mammalogy* 86:255-264.
- Crozier, R. H., and P. Pamilo. 1996. *Evolution of Social Insect Colonies*. Oxford University Press, Oxford.

- Cuvillier, H. V., A. Lenoir, R. Crewe, C. Malosse, and C. Peeters. 2004a. Fertility signaling and reproductive skew in queenless ants. *Anim Behav* 68:1209-1219.
- Cuvillier, H. V., A. Lenoir, and C. Peeters. 2004b. Reproductive monopoly enforce by sterile police workers in queenless ant. *Behavioral Ecology* 15:970-975.
- Cuvillier-Hot, V., A. Lenoir, R. Crewe, C. Malosse, and C. Peeters. 2004a. Fertility signaling and reproductive skew in queenless ants. *Anim Behav* 68:1209-1219.
- Cuvillier-Hot, V., A. Lenoir, and C. Peeters. 2004b. Reproductive monopoly enforce by sterile police workers in queenless ant. *Behav Ecol* 15:970-975.
- Emlen, S. T. 1995. An evolutionary theory of the family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8092-8099.
- Endler, A., J. Liebig, T. Schmitt, J. E. Parker, G. R. Jones, P. Schreier, and B. Holldobler. 2004. Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 101:2945-2950.
- Evans, J. D., and J. S. Pettis. 2005. Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. *Evolution* 59:2270-2274.
- Field, J., A. Cronin, and C. Bridge. 2006. Future fitness and helping in social queues. *Nature* 441:214-217.
- Foster, R. L., A. Brunskill, D. Verdirame, and S. O'Donnell. 2004. Reproductive physiology, dominance interactions, and division of labour among bumble bee workers. *Physiological Entomology* 29:327-334.
- Fukumoto, Y., T. Abe, and A. Taki. 1989. A novel form of colony organization in the "queenless" ant *Diacamma rugosum*. *Physiol. Ecol. Japan* 26:55-61.
- Gadagkar, R. 1991. *Belongaster*, *Mischocyttarus*, *Parapolybia*, and independant-founding *Ropalidia*. Pp. 149-190 in K. G. R. W. Matthews, ed. *The social biology of wasps*. Cornell University Press, Ithaca.
- Gillespie, J., M. R. Kanost, and T. Trenczeck. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42:611-643.
- Gobin, B., J. Heinze, M. Strätz, and F. Roces. 2003. The energetic cost of reproductive conflicts in the ant *Pachycondyla obscuricornis*. *Journal of Insect Physiology* 49:747-752.
- Gorman, M. J., and S. M. Paskewitz. 2000. Persistence of infection in mosquitoes injected with bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology* 75:296-297.
- Goymann, W., and J. C. Wingfield. 2004. Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter. *Anim Behav* 67:591-602.
- Hannonen, M., M. Sledge, S. Turillazzi, and L. Sundstrom. 2002. Queen reproduction, chemical signaling and worker behaviour in polygyne colonies of the ant *Formica fusca*. *Anim Behav* 64:477-485.
- Hawley, D., K. Lindström, and M. Wikelski. 2006. Experimentally increased social competition compromised humoral responses in house finches. *Hormones and behavior* 49:417-424.
- Hawley, D. M., C. S. Jennelle, K. V. Sydenstricker, and A. A. Dhondt. 2007. Pathogen resistance and immunocompetence covary with social status in house finches (*Carpodacus mexicanus*). *Functional Ecology* 21:520-527.
- Heinze, J., B. Holldobler, and C. Peeters. 1994. Conflict and Cooperation in Ant societies. *Naturwissenschaften* 81:489-497.
- Keller, L., and E. L. Vargo. 1993. Reproductive structure and reproductive roles in colonies of eusocial insects in L. Keller, ed. *Queen Number and Sociality in Insects*. Oxford University Press, Oxford.

- Koskimäki, J., M. J. Rantala, J. Taskinen, K. Tynkkynen, and J. Suhonen. 2004. Immunocompetence and resource holding potential in the damselfly, *Calopteryx virgo* L. *Behav Ecol* 15:169-173.
- Lackie, A. M. 1988. Haemocyte behaviour. *Advances in insect physiology* 21:85-178.
- Lacoste, A., S. K. Malham, A. Cueff, F. Gélébart, and S. A. Poulet. 2001a. Evidence for a form of adrenergic response to stress in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Biol* 204:1247-1255.
- Lacoste, A., S. K. Malham, A. Cueff, and S. A. Poulet. 2001b. Stress-induced Catecholamines changes in the haemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gen Comp Endocrinol* 122:181-188.
- Lacoste, A., S. K. Malham, F. Gélébart, A. Cueff, and S. A. Poulet. 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 26:1-9.
- Le Moullac, G., C. Soyeux, D. Saulnier, D. Ansquer, J. C. Avarre, and P. Levy. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology* 8:621-629.
- Lochmiller, R. L., and C. Deerenberg. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88:87-98.
- Malham, S. K., A. Lacoste, F. Gélébart, A. Cueff, and S. A. Poulet. 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology Part A-Comparative Experimental Biology* 295A(2):136-144.
- Mock, D. W., and G. A. Parker. 1997. *The evolution of sibling Rivalry*. Oxford University Press, Oxford.
- Monnin, T., C. Malosse, and C. Peeters. 1998. Solid-phase extraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *Journal Of Chemical Ecology*. 24:473-490.
- Monnin, T., and C. Peeters. 1999. Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. *Behav. Ecol*. 10:323-332.
- Monnin, T., and F. L. W. Ratnieks. 1999. Reproduction versus work in queenless ants: when to join a hierarchy of hopeful reproductives? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 46:413-422.
- Moret, Y., and P. Schmid-Hempel. 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290:1166-1168.
- Ottaviani, E., and C. Franceschi. 1996. The neuroimmunology of stress from Invertebrates to man. *Progress in Neurobiology* 48:421-440.
- Pascual, C., A. Sanchez, A. Sanchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, and C. Rosas. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218:637-650.
- Peeters, C. 1997. Morphologically 'primitive' ants: comparative review of social characters, and the importance of queen-worker dimorphism. Pp. 372-391 in J. C. Choe and B. J. Crespi, eds. *Social Behavior in Insects and Arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Peeters, C., J. Billen, and B. Hôlldobler. 1992. Alternative dominance mechanisms regulating monogyny in the queenless ant genus *Diacamma*. *Naturwissenschaften* 79:572-573.
- Peeters, C., and J. P. J. Billen. 1991. A novel exocrine gland inside the thoracic appendages ('gemmae') of the queenless ant *Diacamma australe*. *Experientia* 47:229-231.
- Peeters, C., and S. Higashi. 1989. Reproductive dominance controlled by mutilation in the queenless ant *Diacamma australe*. *Naturwissenschaften* 76:177-180.

- Perazzolo, L. M., R. Gargioni, P. Ogliari, and M. A. A. Barracco. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214:19-33.
- Peters, J. M., D. C. Queller, F. V. L. Imperatriz, D. W. Roubik, and J. E. Strassmann. 1999. Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 266:379-384.
- Plaistow, S. J., Y. Outreman, Y. Moret, and T. Rigaud. 2003. Variation in the risk of being wounded: an overlooked factor in studies of invertebrate immune function? *Ecology Letters* 6:489-494.
- Poisbleau, M., H. Fritz, N. Guillon, and O. Chastel. 2005. Linear social dominance hierarchy and corticosterone responses in male mallards and pintails. *Hormones and behavior* 47:485-492.
- Raberg, L., M. Grahn, D. Hasselquist, and E. Svensson. 1998. On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 265:1637-1641.
- Rantala, M. J., and R. Kortet. 2004. Male dominance and immunocompetence in a field cricket. *Behav Ecol* 15:187-191.
- Ratnieks, F., and H. Reeve. 1992. Conflicts in single-queen Hymenopteran societies: the structure of conflict and processes that reduce conflict in advanced eusocial species. *Journal of Theoretical Biology* 158:33-65.
- Ratnieks, F. L. W. 1988. Reproductive harmony via mutual policing by workers in eusocial Hymenoptera. *American Naturalist* 132:217-236.
- Rolff, J., and M. T. Siva-Jothy. 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science* 301:472-475.
- Röseler, P.-F. 1991. Reproductive competition during colony establishment. Pp. 309-335 in M. R. Ross KG, ed. *The social biology of wasps*. Cornell University Press, Ithaca.
- Sands, J., and S. Creel. 2004. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Anim Behav* 67:387-396.
- Schmid-Hempel, P. 1998. *Parasites in social insects*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defense. *Annual Review of Entomology* 50:529-551.
- Sheldon, B. C., and S. Verhulst. 1996. Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 11:317-321.
- Sledge, M., F. Boscaro, and S. Turillazi. 2001. Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behav ecol sociobiol* 49:401-409.
- Stefano, G., and M. Salzet. 1999. Invertebrates opioid precursors: evolutionary conservation and the significance of enzymatic processing. *Int Rev Cytol* 187:261-286.
- Strassmann, J. E., A. Fortunato, R. Cervo, S. Turillazi, J. M. Damon, and D. C. Queller. 2004. The Cost of Queen Loss in the Social Wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 77:343-355.
- Traniello, J. F. A., R. B. Rosengaus, and K. Savoie. 2002. The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 99:6838-6842.
- Tsuji, K., K. Egashira, and B. Hölldobler. 1999. Regulation of worker reproduction by direct physical contacts in the ant *Diacamma sp.* from Japan. *Animal Behaviour* 58:337-343.
- Vainio, L., H. Hakkarainen, M. J. Rantala, and J. Sorvari. 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. *Evolutionary Ecology* 18:75-84.

West-Eberhard, M. J. 1975. The evolution of social behavior by kin selection. *Quarterly Review of Biology* 50:1-33.

Zuk, M., and T. S. Johnsen. 2000. Social environment and immunity in male red jungle fowl. *Behav Ecol* 11:146-153.

Table 1: Characteristics of the 20 colonies and basic data on aggressions. For each colony is given the number of workers (N_{workers}) in each group after splitting (the number was the same for the two groups of a given colony), the total number of aggressions in the orphaned group, the number of days between the splitting event and the immune response measurement (N_{days}), and the number of workers which died during this interval in both groups. The last column indicates whether (+) or not (-) behavioral scans were performed for each colony.

Colony	N_{workers}	Total number of aggressions	N_{days}	$N_{\text{dead workers}}$		Behavioral scan
				Control g.	Orphaned g.	
1	80	1104	8	2	13	-
2	80	1363	8	5	3	-
3	80	970	8	6	1	-
4	80	606	8	5	5	-
5	52	220	8	9	2	+
6	75	496	8 / 15	6 / 7	7 / 10	+
7	67	1015	8 / 15	3 / 3	8 / 12	+
8	67	767	8 / 15	8 / 8	2 / 2	+
9	72	1478	8 / 15	5 / 7	4 / 4	+
10	81	360	8 / 15	2 / 3	1 / 3	+
11	82	325	8 / 15	1 / 2	4 / 7	+
12	78	37	8 / 15	0	1 / 1	+
13	70	377	8 / 15	10 / 11	4 / 8	+
14	78	867	15	0	7	-
15	57	431	15	1	2	-
16	53	753	15	5	6	+
17	62	435	15	6	4	
18	58	58	15	7	6	+
19	68	720	15	3	3	+
20	63	705	15	3	7	+

Table 2: Time activity budgets in 14 control and orphaned groups. For each individual, the frequency of each behavior was calculated as the percentage of scans in which the behavior was observed. The values presented in the table correspond to the average of the frequency among individuals for each group. The total labor was subdivided in “Brood care” and “Others”, which includes nest maintenance and foraging.

	Frequency (% , \pm SE)	
	Control group	Orphaned group
Total labor	35.6 \pm 0.9	29.3 \pm 0.8
- Brood care	17.7 \pm 0.7	13.5 \pm 0.6
- Others	17.9 \pm 0.9	15.9 \pm 0.8
Resting	29.2 \pm 0.7	28.8 \pm 0.7
Aggressive interactions	0.2 \pm 0.04	5.9 \pm 0.4
Others	35.1 \pm 0.6	35.9 \pm 0.6

Table 3: Analysis of the bacterial count using mixed models (glmmADMB function in R), including treatment (T) and volume (V). Colony (Col) and interaction treatment by colony (T(col)) were included as random factors. For each model the log(likelihood) (L) and the number of parameters (npar) are given. Effects are tested by comparing models using the likelihood ratio test (LRT).

8 days		Models compared		LRT		
Effect tested	Fixed terms / random terms	Log(L)	npar	χ^2	Df	P
Treatment	1. T + V / Col	- 6157.34	6	4.12	1	0.042
	2. V / col	- 6159.40	5			
Volume	1. T + V / T(Col) + Col	- 6157.08	7	1.32	1	0.25
	3. T / T(Col) + Col	- 6157.74	6			
Treatment(col)	1. T + V / T(Col) + Col	- 6157.08	7	0.52	1	0.47
	5. T + V / Col	- 6157.34	6			

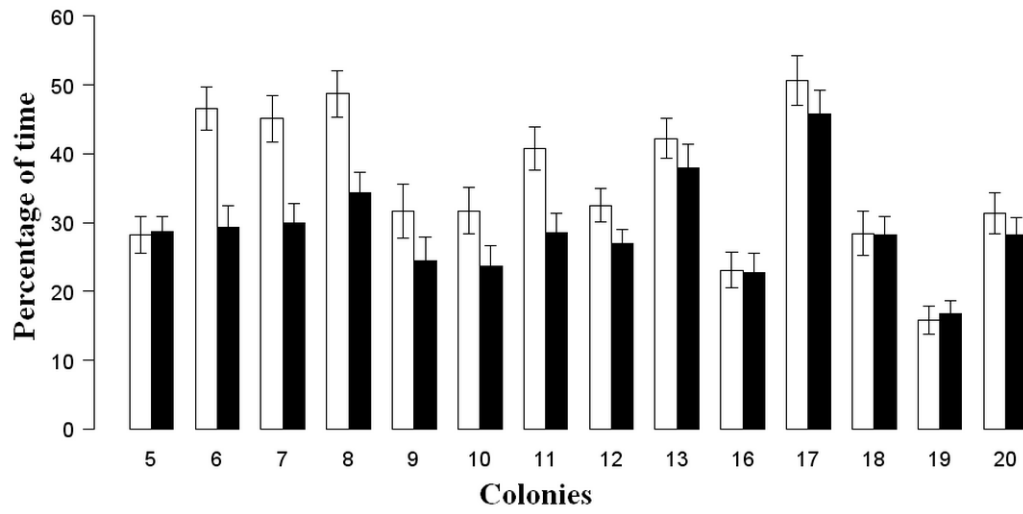
15 days		Models compared		LRT		
Effect tested	Fixed terms / random terms	Log(L)	npar	χ^2	Df	P
Treatment	1. T + V / Col	- 5046.34	6	7.1	1	0.008
	2. V / col	- 5049.89	5			
Volume	1. T + V / T(Col) + Col	- 5046.35	7	0.24	1	0.62
	3. T / T(Col) + Col	-5046.47	6			
Treatment(col)	1. T + V / T(Col) + Col	- 5046.35	7	0.02	1	0.89
	5. T + V / Col	- 5046.34	6			

Figure legends

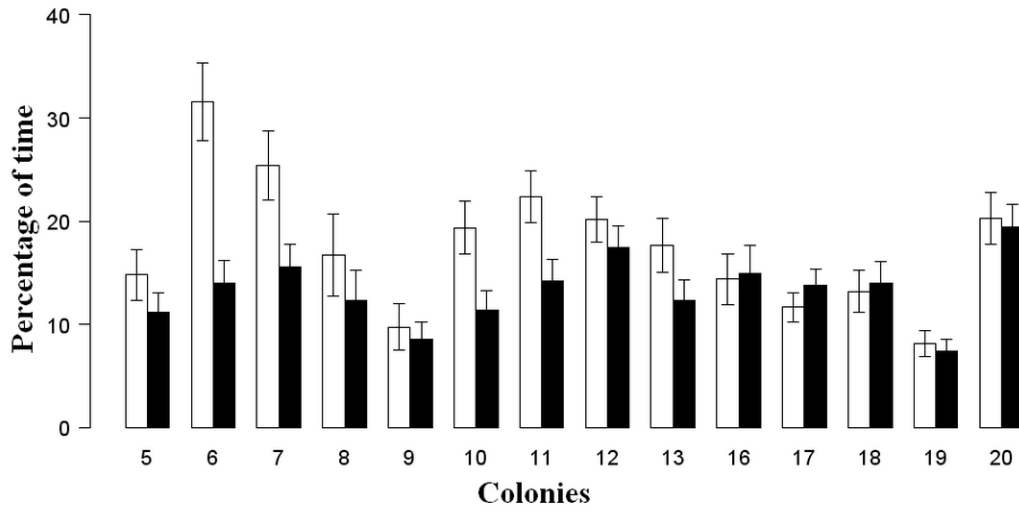
Fig1 Percentage of scans where workers from control (white bars) and orphaned groups (black bars) were recorded performing a given behavior for each colony. A: Total Labor ; B: Brood care ; C: Resting. Bars represent standard errors.

Fig 2 Comparison of mean bacterial count in control groups (white bars) and orphaned groups (black bars). A: 8 days after splitting. B: 15 days after splitting. Bars represent standard errors.

A. Total labour



B. Brood care



C. Rest

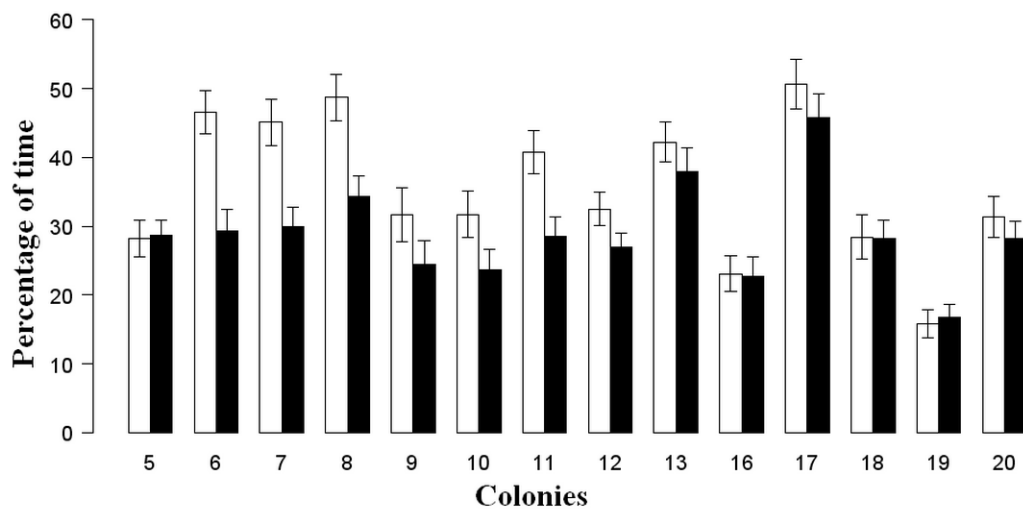


Fig. 1

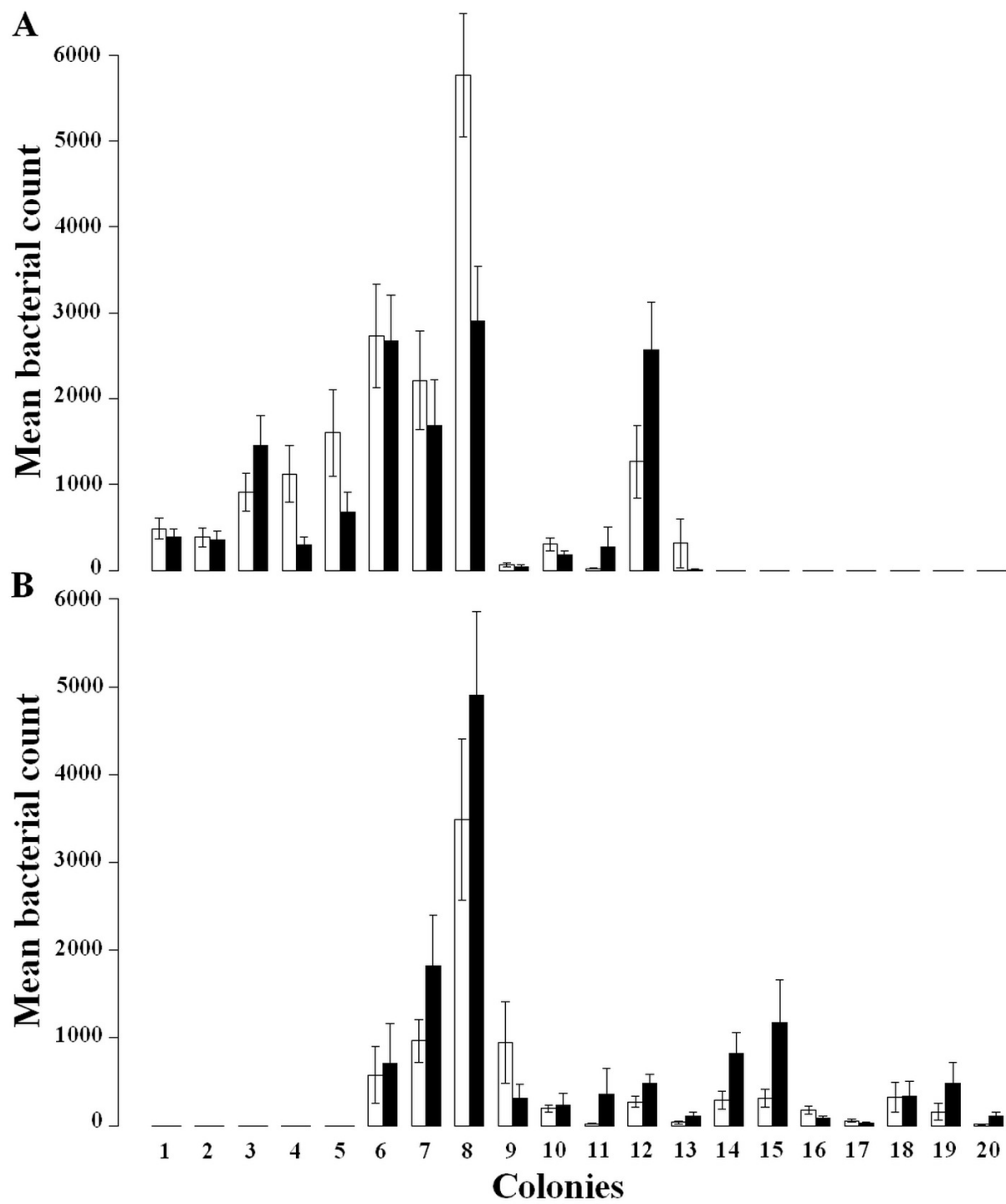


Fig. 2

Phenotypic plasticity of immune defence linked with foraging activity in the ant *Cataglyphis velox*

Aurélie Bocher,^{*} Claire Tirard^{*} & Claudie Doums[‡]

^{*} Laboratoire de Parasitologie Evolutive, CNRS UMR 7103, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

[‡] Laboratoire Fonctionnement et Evolution des Systèmes Ecologiques, CNRS UMR 7625, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

e-mail :

aurelie.bocher@snv.jussieu.fr

claudie.doums@snv.jussieu.fr

claire.tirard@snv.jussieu.fr

Running head: Phenotypic plasticity of immune defence

Abstract

Because immune defences are costly, life-history theories predict a modulation of immune investment according to its potential benefits. Social insects provide interesting models since infection risk may vary among individuals within a colony. In particular, the foraging workers, that have to leave the nest, suffer a higher infection risk and can contaminate their nest, which may favour high immune investments. However, evolutionary theories of aging predict that foragers should reduce their immune investment when they suffer high extrinsic mortality. To test these two predictions, we investigated the levels of phenoloxidase (PO) and prophenoloxidase (PPO), two important enzymes of the insect immune system, in workers of the ant *Cataglyphis velox*. We found a higher PO activity in foragers than in intra-nidal workers. This could result from an adaptive up-regulation of the harmful PO (an enzyme potentially leading to autoimmune reactions) only when the risk of infection and wounding is high.

Keywords: phenoloxidase, prophenoloxidase, PO, PPO, pathogen exposure, infection risk

The potential costs of maintaining a basic level of immune defence and of mounting an immune response have now been demonstrated in a large number of studies (e.g. Lochmiller & Deerenberg, 2000; Rolff & Siva-Jothy, 2003; Schmid-Hempel, 2005). Because of these costs, life-history theory predicts that the optimal investment in immune defence should vary over a wide range of individual states and parasitic pressures (Sheldon & Verhulst, 1996). In this context, social insects and particularly ants provide interesting models since, in a given colony, individuals can widely differ in the conditions they are exposed to. A sharp division of labor occurs between reproductive and sterile females: only one or a few individuals mate and lay fertilized eggs (the queen caste), whereas the majority of the female nestmates do not reproduce (the worker caste). They instead assume all other tasks in the colony and often specialize, temporally or permanently, in some particular roles (Bourke & Franks, 1995). The caste is determined either during larval stage through differential feeding in eusocial species such as ants or during adult life by social interactions in primitively social species such as some bees and wasps (Hölldobler & Wilson, 1990). Individuals can therefore display different life-history patterns and suffer from different parasitism pressures according to their function within the colony. Moreover, because workers generally do not reproduce, their inclusive fitness is determined by their survival and working capability, and immune defence, which influences both these parameters, should therefore be particularly important (Doums et al., 2002). Among the worker caste, the most obvious distinction is between foragers that go outside in search of food and workers that stay in the nest (intra-nidal workers). Foragers are clearly subjected to a higher extrinsic mortality rate due to predation and risk of being lost (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1984) and suffer harsher environmental conditions, such as high temperature and high risk of being wounded (Cerdá & Retana, 1997). A different immune investment in foragers and intra-nidal workers could then be expected and two main distinct predictions can be formulated.

First, according to the evolutionary theories of aging, foragers should invest less in immune defence. Indeed, selection on parameters enhancing survival, such as immune investment, should decrease with age as the external mortality reduces the probability of survival (Rose, 1991). This senescence process should be accelerated in foragers that suffer a dramatic increase in external mortality. Indeed, a down-regulation of immune system at the onset of foraging was shown in worker bees and interpreted as a lower investment in the maintenance of the foragers soma, allowing resources saving at the colony level (Amdam et al., 2004; Omholt & Amdam, 2004). According to this senescence hypothesis lower immune defence should be expected in foragers. Second, investment in immunity should be modulated

according to pathogen exposure, which also can differ between foragers and intra-nidal workers. Foragers could be exposed to a higher infection risk than intra-nidal workers, at least for some pathogens, but above all, the risk of being wounded is likely to be higher for foragers. Because wounding creates an entry point for pathogens, and because some immunity factors are involved in wound healing, foragers are expected to invest more in immune defence. Even though foragers have a lower probability of survival, investing in immune defence could still be important if foraging increases the risk of pathogen transmission to colony members (Schmid-Hempel, 1998). This “exposure risk hypothesis” therefore predicts the inverse of the senescence hypothesis, which is a higher immune defence in foragers.

Ecological immunity of social insects has been investigated especially in termites, bees and bumble bees, and immunological studies in ants have begun only recently (Hughes & Boomsma, 2004; Vainio et al., 2004; Baer et al., 2005; Baer et al., 2006). Indeed, their small size necessitates adapting methods, but their diverse and complex social systems offer many experimental opportunities. We here used colonies of the ant *Cataglyphis velox* as a model system. In this genus, as in most ant species, division of labour is age-related: young workers are nurses and switch to foraging as they age. Moreover, field studies suggested that large workers were more common among foragers (Cerdá & Retana, 1997). Task switching occurs from intra-nidal tasks to foraging, and adaptive phenotypic plasticity should translate into a change in immune parameters at the onset of foraging. Our approach consisted in testing whether foragers and intra-nidal workers differ in their level of immune defence. Given that the environmental conditions experienced by foragers as well as the energy required for foraging may directly affect the immune system, the study was conducted in the laboratory with a small foraging area. Environmental conditions, pathogen exposure and energy expenditure of workers are then probably not very different from what workers experience in the nest.

One of the main processes involved in insect immune defence is encapsulation, which corresponds to the adhesion and aggregation of haemocytes around the foreign particle, forming a capsule that is then melanized. Both steps require the prophenoloxidase cascade, since components of this system are involved in bacteria-haemocytes adhesion (da Silva et al., 2000), and the phenoloxidase enzyme (PO) catalyses the melanin synthesis. The inactive form of PO is the prophenoloxidase (PPO), produced by haemocytes, which is cleaved to PO by serine-proteases activated by the microbial cell wall components (Söderhäll & Cerenius, 1998). PO activity is a major factor of resistance against parasites (Nigam et al., 1997; Reeson et al., 1998) and is also involved in wound healing (Siva-Jothy et al., 2005) which makes it

particularly crucial for foragers. We measured both the levels of PO and PPO, as they can reflect different strategies. PPO is the storage form thus its level is more likely to indicate immune investment, whereas PO level corresponds to the amount of active enzyme and reflects the regulation of active components of the immune system.

Materiel and methods

Ants

Cataglyphis velox is a Mediterranean species living in dry habitats. *Cataglyphis* ants are thermophilic species, with most workers foraging at the hottest hours of the day (Cerdá & Retana, 1997). Worker body size ranges from 4.5 to 12 mm, which is convenient for manipulation, observations and immunological assays. Colonies are monodomous and consist of about 400 to 1900 workers and several queens, allowing the collection of complete queenright colonies. Our colonies were collected near Granada in Sierra Nevada (south Spain) in May 2006. In the laboratory, they were reared in plaster nests kept in darkness and connected to a foraging area under a 12h light/ 12h dark cycle. Colonies were maintained at 26°C and fed with crickets, sugar and fruit.

Experimental design

The experiment was conducted in August and September 2006 on four colonies (A, B, C, D, respective colony sizes = 753, 938, 621 and 445 ants, with 3, 5, 5, 3 queens). Foragers, identified as ants that walk around the foraging area were marked with spots of coloured paint. During two weeks, foraging areas were regularly checked and foragers were marked until no unmarked forager was found. All foragers were removed (number in each colony, A: 90, B: 118, C: 26, D: 33) along with a sample of intra-nidal workers randomly chosen (from 30 to 40 depending on the time available). The same day, the haemolymph of all these ants was sampled in preparation for PO and PPO assays. To avoid a difference in the amount of time the ants waited before the manipulation, we removed the haemolymph alternately from a small group of foragers or intra-nidal workers. Given that the mortality rate of foragers is low in the lab, this first set of foragers might have been foraging for a long time in the laboratory and even in the field. Removing foragers induced some intra-nidal workers to start foraging. We marked them during one week, and the 7th day, these new foragers (number in each colony, A: 29, B: 46, C: 18, D: 28), along with 30 to 40 intra-nidal workers, were collected and their PO and PPO levels measured. Since these workers were foraging for less than a week and only in the laboratory, they were unlikely to have suffered conditions that would significantly affect their immune system. We therefore postulate that a difference in immunity between this second set of foragers and intra-nidal workers should correspond to a plastic

regulation of immune system rather than to a proximate effect of foraging conditions. The delay of one week was chosen because the foragers life expectancy in the field is generally short (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1984). If a change in the immune investment occurs, it should then be detected not more than a few days after the onset of foraging.

PO and PPO assays

PO and PPO assays followed a method adapted from Moret (Moret, 2001). Ants were cold anaesthetized on ice and after decapitation, haemolymph was removed from head and thorax using a disposable graduated capillary tube. The volume of haemolymph collected from each ant varied from 0.2 to 2.5 μ l. This haemolymph was diluted (1/50) in ice-cold sodium cacodylate/CaCl₂ buffer (0.01 M Na-Cac, 0.005 M CaCl₂). Samples were immediately frozen in liquid nitrogen at -196°C and then stored at -80°C . Freezing ensures the disruption of haemocyte membranes and thus the release of cellular PPO.

PO was quantified without further activation, while the proenzyme PPO was assayed after its activation with chymotrypsin to the active PO (Jacot et al., 2005). Reaction mixtures were done on a 96-well plate placed on ice. 10 μ l of diluted haemolymph was mixed with 5 μ l of distilled water for PO measurement or 5 μ l of alpha-chymotrypsin (5mg/ml in distilled water; prepared freshly) for PPO measurement, and then incubated for 5 min at room temperature. As a substrate, 35 μ l of L-DOPA (4mg/ml in distilled water; prepared freshly and protected from light) was added in each well and the reaction was allowed to proceed at 30°C in a pre-warmed temperature-controlled spectrophotometer (Microplate reader 680, Biorad, CA, USA) for 30 min. The absorbance at 492 nm was measured every 10 sec. For each data point, the enzyme activity was determined as the slope of the linear phase of the reaction (generally between 300 and 600s after the reaction began) using Microplate Manager 5.2 software. These measures are repeatable since data for replicates are highly correlated (intra-class correlation coefficient, PO: $r = 0.850$, PPO: $r = 0.931$). Negative controls (one for PO and one for PPO per plate) containing buffer instead of haemolymph-buffer mixture showed always horizontal or quasi-horizontal kinetic curves and minimal activity (0 or 0.1 mOD/min). Since PO and PPO measures required 0.2 μ l each, only PPO activity could be assayed when less than 0.4 μ l of haemolymph could be collected. When the volume of haemolymph sampled was insufficient or the absorbance curve was too irregular, the data point was eliminated.

Size measurements

All ants sampled were later measured using a binocular microscope associated to a Sony XCD-SX910CR video camera module. Image J 1.32j software was used to analyse the digital pictures. Since different morphological measures (body length, head width and tibia length) were highly correlated (body length-head width, $R^2 = 0.96$; body length-tibia length, $R^2 = 0.95$; tibia length-head width, $R^2 = 0.95$), only the most repeatable was used, i.e. the tibia length.

Data analyses

Analyses were carried out using mixed models, with $\log(\text{PO activity})$ or PPO activity, as dependent variables with normally distributed errors. The independent variables were worker task (intra-nidal worker/forager), time (1st or 2nd sample), tibia length and colony of origin, with all interactions at the second order. We also performed a mixed model with tibia length as dependent variable and worker task (intra-nidal worker/forager), time (1st or 2nd sample), colony of origin and their interactions at the second order as independent variables. For all analyses, the main effect of colony and all its interactions were considered as random factors. Random terms and interaction terms were removed from the model when not significant ($p > 0.1$). Residuals of the dependant variables were checked for normal distributions. All the analyses were performed using Proc MIXED of SAS 8.2 for Windows (SAS Institute, 2001).

Results

PO and PPO activities

Data on PO activity were collected for 287 foragers and 186 intra-nidal workers and PPO activity was assayed on a total of 367 foragers and 249 intra-nidal workers from the 4 colonies. No covariance structure was found, therefore all random effects were removed. PO activity was significantly higher in foragers than in intra-nidal workers (Table 1, Table 2, Fig. 1). The absence of “time” and time by task effects reveals that the same conclusions can be drawn for the first set of foragers, which might have been foraging for a long time, and the second set of foragers which only have experienced a few days of foraging in the laboratory. Indeed, no difference was found between the two sets, considering only intra-nidal workers (effect of time: $F_{1, 183} = 0.42$, $P = 0.52$) or only foragers (effect of time: $F_{1, 284} = 1.26$, $P = 0.26$). Body size assessed by tibia length was a significant predictor of PO activity with large workers having higher PO levels (Table 2, Fig. 1). However, the PO-body size correlation analysis showed that body size accounts for only 1.3% of the variance of PO ($r^2 = 0.013$, $P = 0.014$). No significant effect of the interaction size by task was found, indicating that the effect of task on PO level does not vary with worker size.

A strong positive relationship was found between size and PPO activity (Table 2, Fig. 2) and the PPO-body size correlation analysis showed that body size accounts for 28% of the variance of PPO ($r^2 = 0.28$, $P < 0.001$). This relationship appeared slightly different for foragers and intra-nidal worker in colonies C and D (which explained the significant interaction task by size), but not in colonies A and B. Contrary to the PO, PPO did not differ between intra-nidal workers and foragers (Table 1, Table 2, Fig. 2). However, a significant effect of time was found, mainly because in colony D there was a higher PPO activity for the second set of workers. Both intra-nidal workers and foragers were affected, as shown by the same model including only intra-nidal workers (effect of time: $F_{1, 246} = 7.35$, $P = 0.007$), or only foragers (effect of time: $F_{1, 364} = 6.49$, $P = 0.011$).

Worker body size

The fitted minimal model to explain variability in worker body size included task and time. Foragers were found to be larger than intra-nidal workers (mean size \pm SD, intra-nidal workers of colony A: 3.11 ± 0.68 , B: 3.00 ± 0.73 , C: 3.06 ± 0.77 , D: 3.01 ± 0.74 ; foragers

of colony A: 3.09 ± 0.70 , B: 3.22 ± 0.61 , C: 3.40 ± 0.73 , D: 3.31 ± 0.57) and this difference was significant ($F_{1, 638} = 7.41$, $P = 0.007$). We also found that workers were globally smaller in the second measurement than in the first one ($F_{1, 638} = 3.95$, $P = 0.047$), which could result from the removal of the largest individuals when removing the first set of foragers.

Discussion

PO activity was found to be higher in foragers compared to intra-nidal workers, including those that had only been foraging for a few days under laboratory conditions. This indicates that the difference observed does not simply result from a change in environmental conditions. Moreover, the PO for intra-nidal workers did not differ between the two series, indicating that the removal of foragers did not affect the PO level of intra-nidal workers. We might have expected a decrease of PO for intra-nidal workers from the second measurement if individuals with higher PO were more likely to go foraging. Overall these results suggest that the difference observed reflects a phenotypic plasticity of PO. Fast and reversible changes in immune investment have been shown in bees in relation to worker function in the colony (Amdam et al., 2004; Amdam et al., 2005) or in termites during the crucial stage of colony foundation (Calleri et al., 2007). To demonstrate unambiguously that the higher PO of foragers observed in our study is directly linked to the onset of foraging activity, it would be necessary to measure the same individuals before and after the onset of foraging. However, the removal of a volume of haemolymph sufficient to perform the immune assays is lethal for these small organisms.

The increase in PO activity in foragers is in agreement with the prediction of the exposure risk hypothesis but not with the theory of aging. Because PO is involved in encapsulation, but also probably in wound healing (Hoffmann, 1995; Plaistow et al., 2003), its up-regulation in foragers would help them facing the high risk of being wounded and subsequently infected outside the nest. Plasticity in PO could also arise from a variation in the need of cuticle melanization (Rolff & Siva-Jothy, 2003) as these traits are generally positively related (Wilson et al., 2001; Cotter & Wilson, 2002; Armitage & Siva-Jothy, 2005). This process should improve the efficiency of the cuticle in preventing pathogens intrusion (Wilson et al., 2001), but also the resistance to wounding and desiccation which would be particularly beneficial in a thermophilic species like *Cataglyphis velox*. In other ant species of dry habitats, cuticular hydrocarbons composition differ between workers of different task groups with outside workers showing higher proportions of compounds conferring desiccation resistance (Wagner et al., 1998).

Why was the difference found in PO between intra-nidal workers and foragers not observed for PPO? PO activity was found much less than PPO activity, in accordance with previous insect studies (Adamo, 2004; Jacot et al., 2005), and the existence of

immunopathologic effects (Söderhäll & Cerenius, 1998). The correlation with worker body size was also much stronger for PPO, which therefore appears much less constrained than PO. Immune challenges probably induce only a low fraction of PPO to be converted into PO (Jacot et al., 2005), and an increase in the level of PPO amount should provide fewer benefits compared to an increase in PO. Moreover PO activity should be enhanced only when necessary in order to limit its pathologic effects. For these reasons, it is more likely to observe a phenotypic plasticity for PO than for PPO under the exposure risk hypothesis as observed in our study.

Since no evidence of a reduction in immunity was found in foragers of *Cataglyphis velox*, the senescence process is not obvious for the physiological parameters measured here. Several studies in social insects observed longevity pattern in accordance with the evolutionary theories of aging (Keller & Genoud, 1997; Chapuisat & Keller, 2002; Hartmann & Heinze, 2003) and senescence of an immune response (the ability to encapsulate a nylon filament) has been observed in a bumble bee (Doums et al., 2002). It would be interesting to test whether other immune parameters, not directly related to wounding, such as the antimicrobial peptides, might be more likely to show a pattern of senescence than the one we measured here.

Both PO and PPO levels positively correlate with worker body size in *Cataglyphis velox*. Two explanations can account for this result. First, this relation could emerge from physiological constraints. Many interspecific studies showed that the metabolic rate per unit of body mass decreases with body mass (Peters, 1983), which should also be true among individuals within a polymorphic species. This implies that the maintenance cost of the same mass of tissue is lower for larger individuals (Peters, 1983), who thus dispose of more resources to invest in costly traits like immune defence. Second, the higher immune defence in large workers could be related to their higher inclination to forage reported in the present study in accordance with field observations performed by Cerda et al. (1997). Such a differential investment according to size could be determined during post-embryonic development, corresponding to early adaptive plasticity. As both mechanisms would result in the same relation between size and immunity, more experiments are needed to disentangle their respective effects.

Our study is, to our knowledge, the first to investigate physiological differences associated with foraging activity in ants. The higher level of PO enzyme found in foragers may correspond to an adaptive mechanism and can be interpreted as a need for immediately active enzyme to face risks associated with foraging activity.

Acknowledgments

We thank A. Lenoir, T. Monnin and M. Molet for their help in collecting colonies and/or improving the manuscript. We also thank two anonymous referees for their helpful comments on the manuscript. This study was supported by the French Ministry of Research “Action concertée incitative jeunes chercheurs” (N° 5183) and the French Foreign Ministry “Picasso programme”.

Literature cited

- Adamo, S. A., 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Insect Physiology* **50**: 209-216.
- Amdam, G. V., Aase, A. L. T. O., Seehuus, S. C., Fondrk, M. K., Norberg, K. & Hartfelder, K., 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology* **40**: 939-947.
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T. B. L. & Omholt, S. W., 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology* **39**: 767-773.
- Baer, B., Armitage, S. A. O. & Boomsma, J. J., 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* **441**: 872-875.
- Baer, B., Krug, A., Boomsma, J. J. & Hughes, C. R., 2005. Examination of the immune response of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinatior* and the effect of infection. *Ins. Soc.* **52**: 298-303.
- Bourke, A. F. G. & Franks, N. R., 1995. *Social evolution in ants*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Calleri, D. V., Rosengaus, R. B. & Traniello, J. F. A., 2007. Immunity and reproduction during colony foundation in the dampwood termite, *Zootermopsis angusticollis*. *Physiological Entomology*
- Cerdá, X. & Retana, J., 1997. Links between worker polymorphism and thermal biology in a thermophilic ant species. *Oikos* **78**: 467-474.
- Chapuisat, M. & Keller, L., 2002. Division of labour influences the rate of ageing in weaver ant workers. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B Biological Sciences.* **269**: 909-913.
- Cotter, S. C. & Wilson, K., 2002. Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. *Heredity* **88**: 229-234.
- da Silva, C., Dunphy, G. B. & Rau, M. E., 2000. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* **24**: 367-379.
- Doums, C., Moret, Y., Benelli, E. & Schmid Hempel, P., 2002. Senescence of immune defence in *Bombus* workers. *Ecological Entomology* **27**: 138-144.
- Hartmann, A. & Heinze, J., 2003. Lays eggs, live longer: Division of labor and life span in a clonal ant species. *Evolution* **57**: 2424-2429.
- Hoffmann, J. A., 1995. Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology* **7**: 4-10.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O., 1990. *The Ants*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, Massachusetts.
- Hughes, C. R. & Boomsma, J. J., 2004. Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. *Evolution* **58**: 1251-1260.
- Jacot, A., Scheuber, H., Kurtz, J. & Brinkhof, M. W. G., 2005. Juvenile immune system activation induces a costly upregulation of adult immunity in field crickets *Gryllus campestris*. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* **272**: 63-69.
- Keller, L. & Genoud, M., 1997. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature* **389**: 958-960.
- Lochmiller, R. L. & Deerenberg, C., 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**: 87-98.

- Nigam, Y., Maudlin, I., Welburn, S. & Ratcliffe, N. A., 1997. Detection of phenoloxidase activity in the hemolymph of tsetse flies, refractory and susceptible to infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Journal of Invertebrate Pathology* **69**: 279-281.
- Omholt, S. W. & Amdam, G. V., 2004. Epigenic regulation of aging in honeybee workers. *Science of Aging Knowledge Environment*. **26**:
- Peters, R. H., 1983. *The ecological implications of body size*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Plaistow, S. J., Outreman, Y., Moret, Y. & Rigaud, T., 2003. Variation in the risk of being wounded: an overlooked factor in studies of invertebrate immune function? *Ecology Letters* **6**: 489-494.
- Reeson, A. F., Wilson, K., Gunn, A., Hails, R. S. & Goulson, D., 1998. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* **265**: 1787-1791.
- Rolff, J. & Siva-Jothy, M. T., 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science* **301**: 472-475.
- Rose, M. R., 1991. *Evolutionary biology of aging*. Oxford university Press, New York.
- Schmid-Hempel, P., 1998. *Parasites in social insects*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Schmid-Hempel, P., 2005. Evolutionary ecology of insect immune defense. *Annual Review of Entomology* **50**: 529-551.
- Schmid-Hempel, P. & Schmid-Hempel, R., 1984. Life duration and turnover of foragers in the ant *Cataglyphis bicolor* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux* **31**: 345-360.
- Sheldon, B. C. & Verhulst, S., 1996. Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 317-321.
- Siva-Jothy, M. T., Moret, Y. & Rolff, J., 2005. Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. *Advances in insect physiology* **32**: 1-48.
- Söderhäll, K. & Cerenius, L., 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinuin in Immunology* **10**: 23-28.
- Vainio, L., Hakkarainen, H., Rantala, M. J. & Sorvari, J., 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. *Evolutionary Ecology* **18**: 75-84.
- Wagner, D., Brown, M. J. F., Broun, P., Cuevas, W., Moses, L. E., Chao, D. L. & Gordon, D. M., 1998. Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbaratus*. *Journal Of Chemical Ecology*. **24**: 2021-2037.
- Wilson, K., Cotter, S. C., Reeson, A. F. & Pell, J. K., 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters* **4**: 637-649.

Table 1 Log(PO activity) and PPO activity (in mOD/min) in intra-nidal workers and foragers at time 1 and time 2 in each colony A, B, C and D. Samples sizes are indicated in brackets. Values are presented as means \pm SD.

Enzyme	Col	Intra-nidal workers			Foragers		
		Time 1	Time 2	Total	Time 1	Time 2	Total
logPO	A	-0.24 \pm 0.24 (33)	-0.17 \pm 0.16 (25)	-0.21 \pm 0.21 (58)	0.10 \pm 0.29 (74)	-0.05 \pm 0.17 (16)	0.07 \pm 0.27 (90)
	B	-0.28 \pm 0.18 (18)	-0.28 \pm 0.18 (30)	-0.28 \pm 0.18 (48)	-0.06 \pm 0.32 (75)	-0.07 \pm 0.18 (38)	-0.06 \pm 0.28 (113)
	C	-0.19 \pm 0.17 (18)	-0.13 \pm 0.29 (17)	-0.16 \pm 0.24 (35)	0.14 \pm 0.25 (21)	0.11 \pm 0.23 (15)	0.12 \pm 0.24 (36)
	D	-0.06 \pm 0.31 (27)	-0.23 \pm 0.27 (18)	-0.12 \pm 0.31 (45)	0.07 \pm 0.31 (24)	0.05 \pm 0.28 (24)	0.06 \pm 0.29 (48)
PPO	A	36.0 \pm 19.0 (38)	45.3 \pm 20.3 (29)	40.0 \pm 19.5 (67)	43.8 \pm 21.6 (85)	35.4 \pm 16.3 (27)	41.8 \pm 20.7 (112)
	B	30.7 \pm 17.7 (27)	33.2 \pm 16.4 (39)	32.2 \pm 16.8 (66)	38.8 \pm 23.0 (106)	43.9 \pm 20.2 (45)	40.3 \pm 22.2 (151)
	C	38.5 \pm 18.0 (27)	39.2 \pm 17.2 (24)	38.8 \pm 17.4 (51)	48.8 \pm 23.6 (26)	36.7 \pm 18.0 (18)	43.8 \pm 22.1 (44)
	D	34.9 \pm 15.3 (36)	44.3 \pm 13.0 (29)	39.1 \pm 15.0 (65)	30.2 \pm 17.5 (32)	52.4 \pm 21.0 (28)	40.5 \pm 22.1 (60)

Table 2 General linear mixed models analysing log(PO activity) and PPO activity.

Factor	d.f.	<i>F</i>	<i>P</i>
(1) Log PO*			
Task	1, 469	69.27	< 0.0001
Time	1, 469	1.64	0.20
Size	1, 469	12.25	0.0005
(2) PPO			
Task	1, 611	2.25	0.13
Time	1, 611	12.98	0.0003
Size	1, 611	239.68	<0.0001
Size x task	1, 611	3.51	0.06

* In the model analyzing log(PO), the interaction size by task was not significant ($F_{1, 468} = 0.02$, $P = 0.89$) and was therefore not included in the final model.

Figures legends

Fig1 Relationship between PO activity (data log-transformed) and tibia length in foragers (filled circles and dashed lines) and intra-nidal workers (empty circles and full lines) for each colony A, B, C and D. For each subgroup, the linear regression line was indicated only when significant.

Fig 2 Relationship between PPO activity and tibia length in foragers (filled circle and dashed lines) and intra-nidal workers (empty circles and full lines) for each colony A, B, C and D.

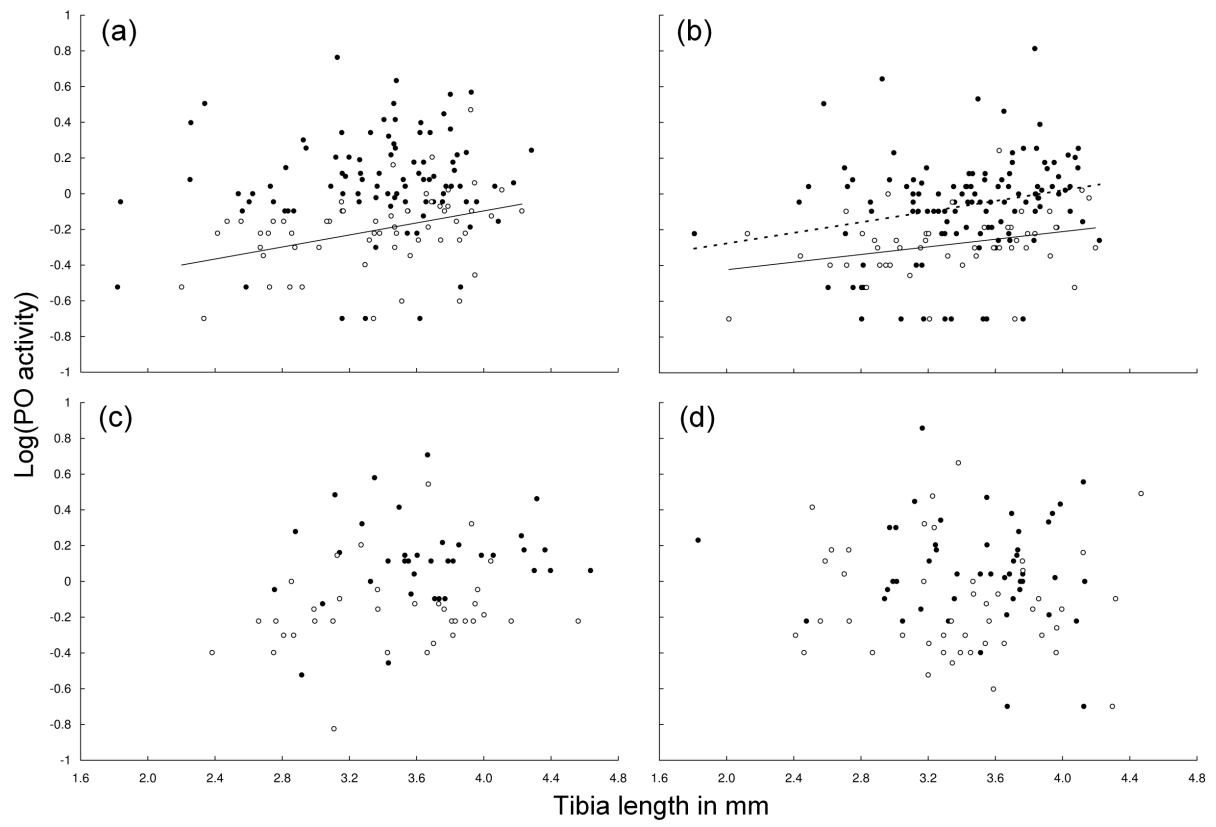


Fig. 1

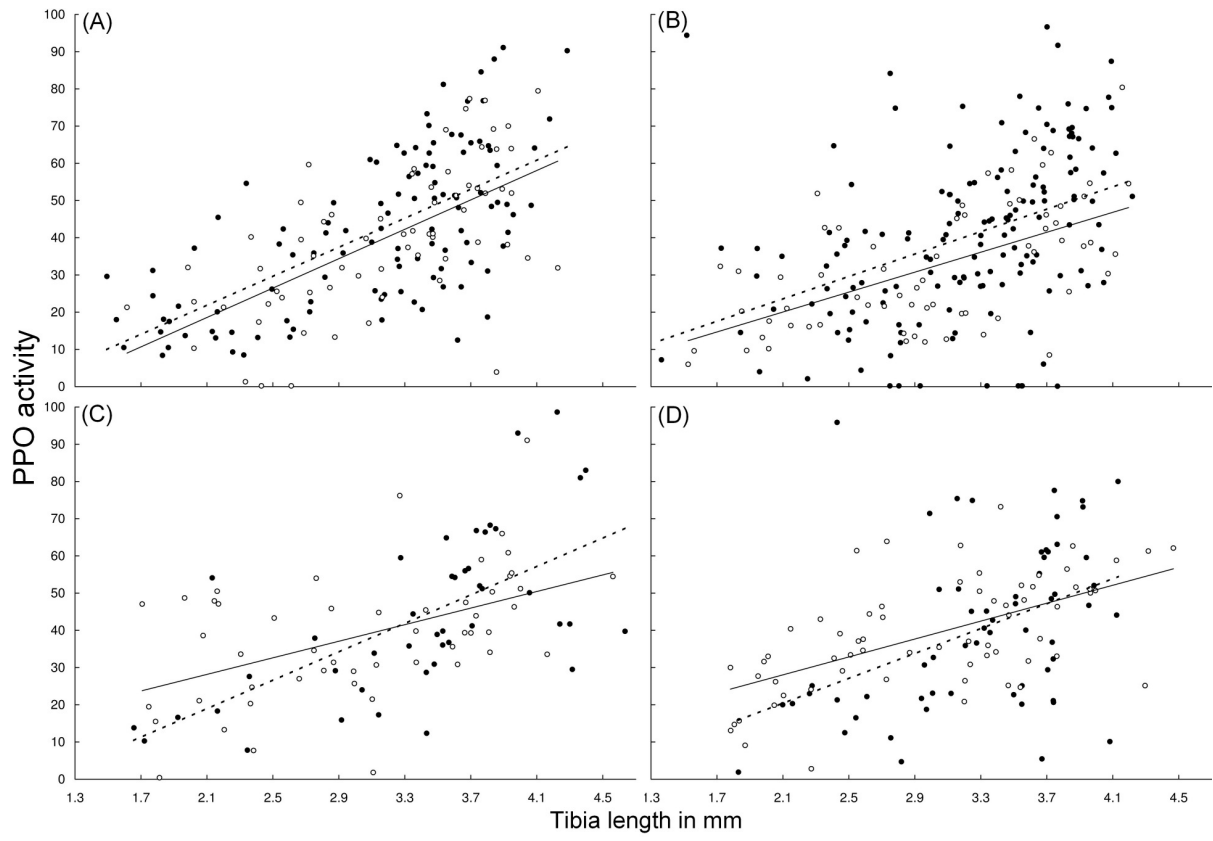


Fig. 2

Individual behaviour and immunological variation

in colonies of *cataglyphis velox*

Aurélie Bocher,^{*} Claudie Doums[‡], Claudy Haussy^{*} & Claire Tirard^{*}

^{*} Laboratoire de Parasitologie Evolutive, CNRS UMR 7103, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

[‡] Laboratoire Fonctionnement et Evolution des Systèmes Ecologiques, CNRS UMR 7625, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

e-mail :

aurelie.bocher@snv.jussieu.fr

claudie.doums@snv.jussieu.fr

claire.tirard@snv.jussieu.fr

claudy.haussy@snv.jussieu.fr

Abstract

The existence of inactive workers in social insects colonies is often mentioned in the literature but their role is still intriguing. They are generally supposed to be a reserve of workforce but evidences are actually scarce and no specific study has addressed this question. Besides, other functions may be fulfilled by inactive workers. Here we proposed that workers allocating few resources in labour could invest more in immune defence, creating heterogeneity in pathogen resistance among workers that may reduce the spread of diseases within the colony. We conducted a behavioural study in the ant *Cataglyphis velox* to investigate the existence of particularly inactive ants and their potential role of reserve. In this aim we analysed how they reacted to a sudden increase in the demand of labour caused by the removal of all foragers. We also measured in all ants the levels of phenoloxidase (PO) and prophenoloxidase (PPO), two major enzymes of the insect immune system, and analysed how they vary with worker activity. This study revealed that the inactivity level is a major parameter explaining the behavioural variability among workers. However, inactive workers were not particularly mobilized following the perturbation, making the role of reserve unlikely. Our results did not support our hypothesis of higher immune defence in inactive workers but this could be tested using other immune assays. We discussed the flexibility of worker behaviour and the signification of the intra-colony variation in activity rate.

Keywords: immune defence, inactive workers, reserve, behavioural flexibility, response to perturbation, phenoloxidase, prophenoloxidase

The adaptive nature of division of labour in social insect has traditionally been analysed in reference to its benefits for the realisation of colonial functions such as brood care, nest provisioning, guarding, building and cleaning. A growing body of experimental and theoretical studies indicate that division of labour may also increase disease resistance (Schmid-Hempel, 1993; Schmid-Hempel, 1998; Hart & Ratnieks, 2001; Pie et al., 2004; Fefferman et al., 2007; Rosengaus & Traniello, 2001; Loehle, 1995). Theoretical models of infection suggest that colony heterogeneity, resulting from different features of division of labour, may be beneficial to the host (Naug & Camazine, 2002; Pie et al., 2004). In the model of Naug and Camazine (2002) the simple existence of subgroups with different probability of contacting a pathogen does not influence the outcome of the disease, but adding a lower rate of contact between than within subgroups reduce the spread of the infection. Similarly, the spatial structure of the nest can be beneficial if it creates several “islands” among which the frequency of interactions is lower than within them (Pie et al., 2004). Moreover, the presence of groups with a differential resistance to infection may lead to a further decrease in the probability of disease persistence in the colony. For example, if the workers that are more exposed to the pathogen survive shorter after infection, the proportion of infectious individuals will be reduced (Naug & Camazine, 2002). Variability in resistance may have different sources. In species that show polymorphism, workers of different castes differ in several physiological characteristics that may influence susceptibility to parasites (Keller, 1995). We proposed that a variation in resistance among workers could also result from differences in their activity level.

According to the life-history theory, the resources of the organism, that are limited, must be shared between costly traits like growth, reproduction and immune defence (Stearns, 1992; Roff, 1992). Extensive studies in vertebrates and invertebrates, including social insects, have proved the existence of energetical and ecological trade-offs between immune defence and other costly functions (Sheldon & Verhulst, 1996; Schmid-Hempel, 2005; Rolff & Siva-Jothy, 2003), in particular muscular activity (Saino & Moller, 1996; König & Schmid-Hempel, 1995; Doums & Schmid-Hempel, 2000; Fitzgerald, 1988). The natural selection process should favour the strategies of resources allocation maximizing the fitness. In social insects the fitness is realised at the colony level therefore this optimisation is not necessarily achieved at the individual level but takes place in the context of division of labour. If there is a variation in activity rate among workers, less active individuals should be able to invest

more in immune defence, which may be beneficial for the colony. In a spatially structured nest, where individuals are predominantly assigned to one part of the nest and do not interact randomly, chain contamination is supposed to occur by repeated transmission from a diseased individual to its susceptible neighbours (Pie et al., 2004; Naug & Camazine, 2002; Fefferman et al., 2007). In such a context, more resistant workers could lower the probability of disease transmission between groups of more susceptible hosts, acting as “immune barriers”. Such an effect would be similar to a limitation in the contact rate between subgroups, that has been shown to be beneficial in preventing disease propagation (O'Donnell, 1997; Mollison & Levin, 1995; Naug & Camazine, 2002).

Variation in the activity rate among workers has been reported in several ants species, some workers being characterized as “lazy” because of their low level of activity (Hölldobler & Wilson, 1990). The observation of a high rate of inactivity in social insect colonies could be first related to the few amount of labour that workers have to perform when reared in the laboratory in artificial nests. However when collecting colonies in the field, lots of workers can also be found grouped in some chambers without brood to care or evident task to assume (Herbers & Cunningham, 1983). It has also been proposed that they could constitute a workforce kept in reserve (Porter & Tschinkel, 1985; Miranda & Vinson, 1981). An increase in general activity has actually been observed in colonies submitted to a perturbation (Robinson, 1992). However inactive ants do not seem to be those predominantly mobilized in cases of danger (Dobrzanska, 1959) or when the demand in foragers increases (Wilson, 1983). The role of inactive workers remains intriguing and few studies have directly addressed this question. Theoretical models have shown that the activity level in the colony affects disease transmission. This effect is quite intuitive since less propagation should occur if animals move less. Workers would therefore better stay motionless if they have nothing to do (which is also energy-saving) but it does not make the production of mostly inactive individuals beneficial. We here hypothesize that these inactive workers may invest more in immune defence and therefore contribute to colony productivity by increasing its resistance to pathogens. Under this hypothesis, the degree of interactions of these inactive ants with other nestmates should not necessarily be reduced, since their lower susceptibility to disease could be sufficient to limit the probability of disease propagation in a normal interaction network.

We conducted a behavioural study in the ant *Cataglyphis velox* to investigate the variation in activity rate among workers and the existence of particularly inactive ants. We then tested whether these inactive ants can be a reserve of workforce. Following this hypothesis they should be mobilized in response to a sudden increase in the demand of labour.

We therefore removed all foragers and tested whether inactive ants subsequently modified their behaviour and analysed which ants were recruited as new foragers. We also measured in all ants the levels of phenoloxidase (PO) and prophenoloxidase (PPO), two major enzymes of the insect immune system, and analysed how they vary with worker activity. Finally, to investigate the function of inactive workers, we also tested whether they differ from other intra-nidal workers in their frequency of social interactions.

Materials and methods

Ants

Cataglyphis velox colonies were collected near Granada in Sierra Nevada (South Spain) in may 2006. In the laboratory, they were reared in plaster nests kept in darkness and connected to a foraging area under a 12h light/ 12h dark cycle. Colonies were maintained at 26°C and fed with crickets, sugar and fruit.

Experimental design

The experiment was conducted on three colonies, named A, B, C, each containing 2 queens. Each colony was reduced to allow behavioural observations, and individuals (number of workers: A: 120, B: 140, C: 140) were marked with spots of colored paint. We then let the colonies stabilize at least for one month. In the colony C, about 100 workers were born during this interval but were not included in the observation. When the experiment started, all colonies contained brood (eggs and larvae), but no cocoons, so no new workers were born during the experiment. Behavioural observations were performed using the technique of scan sampling. Each scan consisted in recording the behaviour performed by each individual. We recorded the following behaviours: foraging, moving in the nest, carrying stones, licking or carrying brood (eggs or larvae), feeding, moving food, feeding the brood, resting, moving only antennas, antennating (communicating with nestmate) and self- or allo-grooming. After 7 days (first period), ants that had been identified as foragers were removed (number of workers in each colony: A: 24, B: 25, C: 30), and behavioural observations were continued for 7 other days (second period). During each 7-days session, 28 to 48 scans were performed on a colony (session 1 and 2, colony A: 48, 37; B: 29, 38; C: 28, 28). However the number of scans for each worker varied since, at each scan, the colored marks of some ants could be not visible. At the end of the second session all the individuals marked were subjected to immunological measurement.

Immune assays

One of the most important constitutive effectors of insect immune system is the enzyme PO, which produces melanin used in the formation of capsules around pathogens.

The melanization of capsules, either inert, cell-free capsules, or capsules formed by the aggregation of haemocytes around large pathogens, results in isolating the pathogen behind an inert and impermeable barrier, thereby killing it (Gillespie et al., 1997). The production of PO from its inactive precursor PPO is triggered via a serine protease cascade initiated by the detection of microbial cell wall components (Söderhäll & Cerenius, 1998). Since PPO is the storage form of the enzyme it may reflect immune investment while PO is the immediately active tyrosinase. Therefore, it is interesting to measure simultaneously these two enzymes.

We collected haemolymph from head and thorax of ants previously cold anaesthetized and decapitated. Haemolymph removed from each ant (between 0.2 to 2.5µl) was diluted (1/50) in ice-cold sodium cacodylate/CaCl₂ buffer (0.01 M Na-Cac, 0.005 M CaCl₂). Samples were immediately frozen in liquid nitrogen at -196°C and then stored at -80°C. Freezing and thawing ensures the disruption of haemocytes membranes and thus the release of cellular PPO.

Since PO and PPO measures required 0.2µl each, we measured only PO activity when less than 0.4µl of haemolymph could be collected. PO was quantified without further activation, while chymotrypsin was added to the haemolymph-buffer mixture to activate the proenzyme PPO into the active PO. On a 96-well plate placed on ice, we mixed 10 µl of diluted haemolymph with 5µl of distilled water for PO measurement or 5µl of alpha-chymotrypsin (5mg/ml in distilled water; prepared freshly) for PPO measurement. We let for 5 min at room temperature to allow the chymotrypsin to act. We then added 35µl of the substrate L-DOPA (4mg/ml in distilled water; prepared freshly and protected from light) in each well. The reaction was allowed to proceed at 30°C in a pre-warmed temperature-controlled spectrophotometer (Microplate reader 680, Biorad, CA, USA), and the absorbance at 492 nm was measured every 10 sec for 30 min. The enzyme activity was determined as the slope of the linear phase of the reaction (generally between 300 and 600s after the reaction began) using Microplate Manager 5.2 software. This measure is repeatable since data for replicates are highly correlated (intra-class correlation coefficient, PO: $r = 0.850$, PPO: $r = 0.931$). Negative controls (one for PO and one for PPO per plate) containing buffer instead of haemolymph-buffer mixture showed always horizontal or quasi-horizontal kinetic curves and minimal activity (0 or 0.1 mOD/min). When the volume of haemolymph sampled was insufficient or the absorbance curve was too irregular, the data point was eliminated.

Size measurement

Cataglyphis velox is a polymorphic species with worker body size showing a large continuous variation from 4.5 to 12 mm. Some experiments in this species suggested that worker size could be a parameter of division of labour (Bocher et al., 2007; Cerdá & Retana, 1997), like in many other polymorphic ant species (Porter & Tschinkel, 1985; Hölldobler & Wilson, 1990). We also knew from a previous study in *Cataglyphis velox* that body size influences hemolymph levels of PO and PPO (Bocher et al., 2007). Worker body size therefore needs to be included as a factor in analyses of worker behaviour and immune defence. Ants body size was assessed by measuring tibia length of the right leg of the metathorax. Pictures of tibias were taken using a binocular microscope associated to a **Leica** video camera module, and then analysed with Image J 1.32j software.

Data analyses

The queens were not included in the analyses. Since the composition of colonies was modified by the removal of foragers, scans of the first and second periods were analyzed separately. For each ant observed for at least 20 scans, the behavioural profile was determined from the frequencies of behaviours exhibited. To determine if ants of a given colony were equivalent or if some ants were particularly inactive, we tested whether the distribution of the frequency of resting (number of scans during which the individual was observed as inactive compared to the total number of scans) differed from a random binomial distribution. This test was performed with the module struc4-exe of the software GENEPOP that computes an unbiased estimate of the exact P-value of the exact Fisher test, using a markov chain method (Raymond & Rousset, 1995). We also realised in each colony a hierarchical classification using euclidean distances and Ward's method for cluster joining, followed by a discriminant analysis to determine the variables that explained the difference between the subgroups identified by the clustering. Variables introduced in the discriminant analysis were: foraging, resting, moving in the nest, moving only antennas, brood care (sum of all care of eggs and larvae) and social interactions (including grooming, contacting nestmate with antennas, and trophallaxis). All multivariate analyses were performed with STATISTICA 7.1 for Windows.

A generalized linear model was built to analyse the overall variation in resting rate between the two sessions. The dependant variable, following a binomial distribution, was the ratio of the number of scans for which the individual was observed resting divided by the total

number of scans, and the independent variables were colony, session and their interaction. The analysis included ants observed during both sessions (this excluded the removed foragers and ants that died during the experiment or that were observed in a too low number of scans). Colony effect was not considered as random because only colonies whose characteristics in the lab allowed the manipulation had been used (in particular very large colonies had been excluded). To test whether the tendency to inactivity of individuals changed across the perturbation, we calculated for each session of observation the standardized resting rates, as the individuals' deviation from their colony means (mean resting rate of the colony subtracted from individual resting rate) and we compared these values between the two sessions.

Immunological data were analyzed using general linear models with $\log(\text{PO})$ or $\log(\text{PPO})$ as dependant variable, colony, resting rate and tibia length as independent variable. Interactions at the second order were also included in the model. We also performed a general linear model with tibia length as dependent variable and resting rate, colony of origin and their interaction as independent variables. A generalized linear model including intra-nidal workers was also built to test a relation between social interactions and worker activity level. The dependant variable, following a binomial distribution, was the ratio of the number of scans for which the individual was observed interacting with nestmates divided by the total number of scans, and the independent variables were colony, resting rate and their interaction. In all these models we included intra-nidal workers only, because the difference between foragers and intra-nidal workers in size, immunological parameters and social interactions may influence the results. Moreover, since PO and PPO were measured at the end of the second session we used behavioural data of the second session. In order to be consistent we did the same for the analyses of PO, PPO and worker size. We checked if similar results were found for the first session. We also checked if all these models gave the same qualitative results when built with the groups defined by the hierarchical classification instead of continuous resting rate as independent variable. General and generalized linear models were performed using Proc GLM or Proc GENMOD, respectively, of SAS 8.2 for Windows. Interaction terms were removed from the model when not significant ($p > 0.1$). Residuals of the dependant variables were checked for normal distributions.

Results

1. Are ants characterized by their activity rate?

Workers were observed resting a large percentage of time (mean resting rate \pm SD for the two sessions in colony A: 0.457 ± 0.251 ; B: 0.645 ± 0.231 ; C: 0.512 ± 0.250). Both in session 1 and session 2, the distribution of the frequency of resting among workers differed from a random binomial distribution (in each colony $P < 0.0001$), showing that in both sessions workers clearly differ in their tendency to inactivity. For the first session, hierarchical clustering in each colony clearly separated inside and outside workers. Among inside workers we distinguished 3 groups, and the discriminant analysis showed that in each colony the resting rate was the major factor explaining the variation among these groups (Significant variables in the model for the colony A: resting: $P < 0.0001$; brood care: $P = 0.0036$; foraging: $P = 0.035$; B: resting: $P < 0.0001$; brood care: $P = 0.017$, moving only antennas: $P=0.011$; C: resting: $P = 0.0011$). The groups were thus identified as “active”, “intermediate” and “inactive” (Fig. 1). Active workers generally performed most of the brood care, which explained that the rate of brood care is also a discriminating variable. Hierarchical clustering on second week data again revealed a classification of individuals into inactive, intermediate and active workers (Fig. 2). Therefore, workers being most of the time inactive were found in both sessions.

2. Are inactive ants a reserve of workforce?

Some new foragers, less numerous, were observed during the second session of observation. In the hierarchical analysis of second week data, these outside workers did not appear clearly separated from others (Fig. 2), probably because they progressively started foraging during the second week and spent less time outside than did the old foragers in the first week (foraging rate of foragers \pm SD, session 1: 0.686 ± 0.238 , $n=79$; session 2: 0.118 ± 0.086 , $n=47$). Workers were then considered as foragers when they spent more than 5% of the time outside the nest. In the hierarchical classification of the first week, they were found mostly among active and intermediate workers: 19.1% were “actives”, 48.9% were “intermediates”, 14.9% were “inactives” . Some could not have been classified (17.0%), since they had been observed in less than 20 scans (see methods): this were ants spending a lot of

time standing in the (yet short) tube connecting the foraging area to the nest. On the contrary workers identified in the first session as inactive in the internal part of the nest were not predominantly recruited as foragers.

The consequences of the removal of foragers on the resting rate of remaining workers varied among colonies (generalized linear model on resting rate of ants observed in both sessions, session: $F_{1, 552} = 40.76$, $P = 0.067$; colony: $F_{2, 252} = 545.19$, $P < 0.0001$; colony by session: $F_{2, 252} = 63.58$, $P < 0.0001$). The resting rate decreased in colony A (mean resting rate \pm SD, session 1: 0.56 ± 0.21 , session 2: 0.43 ± 0.25 , $n = 82$) but did not differ between the two sessions in colonies B and C (in colony B: session 1: 0.71 ± 0.18 , session 2: 0.68 ± 0.19 , $n = 108$; C: session 1: 0.57 ± 0.19 , session 2: 0.59 ± 0.22 , $n = 89$). The standardized rates of resting in session 1 and session 2 were positively correlated ($R^2 = 0.65$, $P < 0.0001$, $n = 279$), indicating that the profile of workers, concerning their tendency to inactivity, was stable across the two sessions of observations.

3. Do inactive workers differ in size, immune defence or interaction rate?

Since resting rate were highly correlated between the two sessions we reported the analyses only for the second session (similar results were found with resting rates in the first session). Inactive workers were smaller than others intra-nidal workers (GLM on tibia length: resting rate: $F_{1, 241} = 16.50$, $P < 0.0001$; colony: $F_{2, 241} = 7.13$, $P = 0.0010$; resting rate by colony: $F_{2, 241} = 3.56$, $P = 0.030$; Fig. 3). The same qualitative results were found when behavioural groups defined by hierarchical classification were used (group: $F_{2, 241} = 3.28$, $P = 0.039$, colony: $F_{2, 241} = 23.87$, $P < 0.0001$). Foragers seemed to be smaller than intra-nidal workers although the differences were not consistent across colonies (position inside/outside: $F_{1, 285} = 4.09$, $P = 0.044$, colony: $F_{2, 285} = 8.22$, $P = 0.0003$, position by colony: $F_{2, 285} = 4.50$, $P = 0.012$).

The resting rate did not have any effect on PO and PPO activities of intra-nidal workers (Table 1, Fig. 4), therefore no evidence was found of a higher immune investment in inactive workers. The same qualitative results were found with behavioural groups (GLM on logPO, group: $F_{2, 221} = 0.78$, $P = 0.46$; colony: $F_{2, 221} = 10.45$, $P < 0.0001$; tibia: $F_{1, 221} = 5.34$, $P = 0.022$; GLM on log PPO: group: $F_{2, 188} = 1.34$, $P = 0.27$; colony: $F_{2, 188} = 39.74$, $P < 0.0001$; tibia: $F_{1, 188} = 36.91$, $P < 0.0001$). Note that PO activity was higher in foragers (GLM on logPO, position inside/outside: $F_{1, 259} = 6.97$, $P = 0.0088$; colony: $F_{2, 259} = 8.87$, P

= 0.0002; size: $F_{1, 259} = 4.65$, $P = 0.032$). We also found that worker body size significantly influenced PO and PPO activities (Table 1), with a stronger effect on PPO, larger workers having higher enzyme levels. These results confirmed those found in a previous study (Bocher et al., 2007).

For intra-nidal workers, the frequency of interactions with nestmates (allo-grooming, trophallaxis and antennating) decreased with the resting rate (generalized model on social interactions: resting rate: $F_{1, 251} = 68.57$, $P < 0.0001$; colony: $F_{2, 251} = 30.64$, $P < 0.0001$; Fig 5). The same qualitative results were found with behavioural groups (group: $F_{2, 250} = 53.66$, $P < 0.0001$; colony: $F_{2, 250} = 9.91$, $P = 0.007$). Inactive workers therefore seemed quite isolated from the social activities.

Discussion

1. Existence of inactive workers in *Cataglyphis velox*

Division of labour was found among workers of *cataglyphis velox*: outside and inside workers can be clearly distinguished and among inside workers some are specialized in brood care, as found in other ant species (Lenoir & Ataya, 1983; Herbers & Cunningham, 1983). However hierarchical clustering classified inside workers mostly according to their activity rate, showing that the first factor explaining variation among inside workers was their tendency to be inactive. A high level of inactivity has often been reported in social insects (bees: Kolmes, 1985; termites: Maistrello & Sbrenna, 1996; ants :Herbers & Cunningham, 1983) as in others animals (reviewed in Herbers, 1981), and some studies have investigated the individual variability in this behavioural trait. The existence of “inactive” workers is often mentioned in the literature, but these terms can refer to various facts. Some authors focused on one particular task, like transporting brood or defending the nest (Le Roux & Le Roux, 1979; Meudec, 1977) and called “inactive” workers that do not participate to this task. In some polymorphic species, the activity level varies between physical castes with very different repertoires (Wilson, 1984). In monomorphic species, behavioural studies often revealed a group of polyvalent workers with intermediate profiles between nurses and foragers, who participate little in social activities (Fresneau, 1994; Lenoir & Ataya, 1983; Jaisson et al., 1988). Lenoir and Ataya (1983) also showed, within the groups identified (like the nurses or the foragers), a great variability among workers, from hypoactives to hyperactives. The individual variability in activity level therefore seems to be a general pattern of social insect colonies.

2. Response to perturbation: inactive workers are not a reserve of workforce

The question of the signification of these inactive workers has been raised by many entomologists, since producing useless workers would be a waste of energy for the colony. They often suggested a role of reserve, which may actually involve two types of colony regulation. On a short time scale, workers are known to adjust their behaviour to environmental stimuli (Gordon, 1996) and their activity level could vary depending on the demand in the task they assume. For example, some studies on *Solenopsis invicta* called “reserves” ants located in the nest periphery, assuming nest maintenance, relaying food from

foragers to nurses and sometimes helping them (Mirenda & Vinson, 1981; Sorensen et al., 1984). Although spending a lot of time motionless, they became more active when food was available. In this case, the apparent inactivity could be related to the fractioning of food supply and the absence of construction work in artificial nests, which may explain the frequent observation of such inactive and polyvalent group in the nest periphery (Fresneau, 1994; Lenoir & Ataya, 1983; Jaisson et al., 1988). A variation in inactivity could also be inherent to this function of intermediate between inside and outside workers. However, in our experiment, the most “inactive” ants often stood in internal parts of the nest and did not assume this role of intermediate (which was rather fulfilled by active workers). Lenoir also reported “hypoactive” ants in groups other than the intermediate one (Lenoir & Ataya, 1983).

At a larger time scale, environmental perturbations may occur that necessitate an increase in workforce or the replacement of lost workers (Porter & Tschinkel, 1985). The existence of reserve workers could allow the colony to face such unpredictable events. In the present experiment we studied the response of colonies of *Cataglyphis velox* to the sudden removal of all foragers. In one colony, the inactivity rate decreased as generally reported after a perturbation causing a deficit in labour (Robinson, 1992; but see Kolmes & Sommeijer, 1992; Kolmes, 1985), but was stable in the two others, indicating a variation between colonies in the response to perturbation (Gordon, 1987; Gordon, 1989). Workers recruited as foragers had before the perturbation mostly an active and intermediate profile, suggesting that inactive workers here were not a reserve of work. This is in accordance with their low rate of social interactions that may not facilitate their mobilisation. In *Pogonomyrmex barbaratus*, Gordon studied the consequences of perturbations affecting one outside task. The increase in workers allocated to this task was ensured both by the switch of workers previously engaged in related outside tasks and the recruitment of “inactive” workers from inside the nest (Gordon, 1987; Gordon, 1989). However, the relative importance of these mechanisms was difficult to evaluate and there was no indication that workers recruited from inside the nest were really inactive. They were more likely intermediate workers, also transitional in the classic age polyethism pattern, that went through a small acceleration of their temporal evolution (Lenoir, 1979). In *Pachycondyla apicalis*, Fresneau (Fresneau, 1994) found that a few inactive workers became nurses when necessary, but that most of them did not participate in social regulation (Jaisson et al., 1988). Meudec (Meudec, 1977) also reported that workers of *Tapinoma erraticum* may respond to a variation in group composition by increasing their effort in brood displacement, but that some ants always remained inactive.

Moreover, we showed that in *Cataglyphis velox* the pattern of inactivity was stable on a two weeks period of time, despite a perturbation that increased the demand in labour. Similarly, in *Myrmica ruginodis*, the ranks of workers according to their participation in brood displacement was highly conserved even after a manipulation that increases the overall activity (Le Roux & Le Roux, 1979). It seems therefore that the regulation of work in ant colonies may not re-equilibrate the workers activity levels, but rather induce a proportional decrease or increase in labour for all individuals. The degree of flexibility is highly variable among ant species (Lenoir, 1987), and the profile of worker is not always easily changed (Fresneau, 1994). In our experiment the new foragers were much less numerous and active outside the nest than the initial ones. Previous studies also supported that the recruitment of a large number of foragers after a strong perturbation may not be immediate and that the differentiation of an intra-nidal worker to a forager is progressive. For instance, after the removal of 90% of media workers, the most efficient foragers in *Atta cephalotes* colonies, an efficient rate of foraging was maintained first by an increase in the activity rate of remaining media workers and by the recruitment of auxiliary workers present in the foraging area but usually less active (Wilson, 1983).

The variability among workers mostly remains despite social regulation, and should therefore reflect important individual characteristics. The level of activity of a worker may correspond to its degree of specialisation (Fresneau, 1994). Indeed, many studies reported that social tasks are mostly assumed by a small number of hyperactive workers (Lenoir & Ataya, 1983; Meudec, 1977; Le Roux & Le Roux, 1979). Specialisation, which allows a high efficiency of workers, underlies most of the adaptive benefit of division of labour. Specialization is gained through competition among workers and fixation after reinforcement on one task, and could therefore result in the existence of workers more or less inactive (Fresneau, 1994). The degree of specialisation could also be related to what Dobrzanska called worker “character” in a study on *Formica* (Dobrzanska, 1959). This author proposed that ants could be characterized by their behaviour facing a perturbation: some are very mobile and aggressive whereas others escape or are indifferent. This characteristic was related to their function, workers staying always in the nest being passive whereas the foragers were very reactive and excitable, and others having intermediate profiles. Finally, even if the heterogeneity in worker activity is a passive effect of worker specialisation, it could provide some advantages: at any time the essential tasks of the colony are assumed by specialists while some workers remain available. Ant biologists indeed agree to postulate that inactive workers should fulfil a specific role in the colony.

3. Are inactive workers characterized by others traits?

Besides the hypothesis of the reserve function, other roles have been proposed (Hölldobler & Wilson, 1990): inactives might be selfish workers saving their resources in a context of reproductive competition (Schmid-Hempel, 1990) or a metabolic caste, converting raw food into glandular secretions for the eventual feeding of the queen and brood (Mirenda & Vinson, 1981). In diverse species some workers can also serve as living reservoirs of liquid food for nestmates (Hölldobler & Wilson, 1990). They are called “repletes” and are easily identified by their distended abdomens. Such role may exist in other species in smaller proportions and for limited periods (Mirenda & Vinson, 1981), and may particularly be fulfilled by inactive workers. In *Cataglyphis velox* we did not notice important variations in abdomen volume, and inactive workers showed low rate of social interactions. Concerning the relative size of inactive workers, few data are found in the literature. In *Pheidole*, the major workers are much more inactive than minors. According to Wilson (1984) this is energy-saving since the higher metabolic rate of majors makes their labour more costly. However this argument holds for such highly dimorphic species where the benefit of producing majors arise from their specific and essential roles like seed milling. In slightly polymorphic species the relative costs of producing and “using” large workers would make the equation more complex. We found here that inactive workers of *Cataglyphis velox* were relatively small. Accordingly, if individual behaviour is stable in the worker life, inactive workers would have a low probability to become foragers, which are mostly chosen among large workers (Cerdá & Retana, 1997). In our study, the relative small size of foragers in the second session could result from the removal of the largest individuals when removing the first set of foragers.

In the present study we postulated that inactive worker may have higher immune defence but this expectation was not confirmed since no effect of the resting rate was found on PO and PPO activities of intra-nidal workers. However we studied only one component of the immune system, the PPO-PO cascade, and it is known that different parameters of the insect immune system can vary independently (Adamo, 2004). The hypothesis of a differential immune investment of workers according to their working load should therefore be tested using other immune assays. However the low interaction rate of inactive workers suggests that they are somewhat outside of the interaction network. Even if they were more resistant, this would therefore hardly have an effect on the disease transmission within the

colony since they could not play a role of “immune barrier” nor efficiently transfer antiseptic factors. Besides, their relative isolation would make them less exposed to infection.

The effect of size on immunocompetence has rarely been tested. Some studies in social insects suggested a difference in pathogen resistance between castes of different size (Müller et al., 1996). In contrast, no effect of size on transmission was found in *Bombus terrestris* (Schmid-Hempel, 1993). Here we showed that larger workers of *Cataglyphis velox* have higher PO and PPO level, which could allow a higher resistance to parasites. That physiological differences between castes may influence susceptibility to parasites has been proposed as a factor favouring the evolution of polymorphism (Keller, 1995; Tooby, 1982). Here we suggest that differences in pathogen resistance between castes (or according to size in a continuous polymorphism system) would create heterogeneity that could limit the propagation of a disease within the colony (Loehle, 1995; Naug & Camazine, 2002; Rosengaus & Traniello, 2001).

Foragers had a higher PO activity than intra-nidal workers, as shown in a previous experiment (Bocher et al., 2007). In the present study, we clearly showed that these new foragers were less active outside the nest than the first ones, making unlikely that proximate effects of conditions suffered by workers outside the nest could explain their higher PO activity. Moreover, foragers appeared to be recruited mostly among active workers that should not differ from others in their PO and PPO levels, since no relation was found between resting rate and PO and PPO activities in intra-nidal workers. This supports that the higher PO level found in foragers is not simply due to an intra-colonial variability in quality, age and physiological parameters but likely results from an increase of PO activity at the onset of foraging, probably related to the higher exposure to pathogens outside the nest.

Our study offered insight in the variation among workers in the level of inactivity and its signification for the colony functioning. We were not able to show relation between PO and PPO levels and resting rate of workers, but we proposed to investigate this question using other immune assays and tests of resistance to various pathogens. We also suggested that the difference in PO and PPO levels among workers according to size may create heterogeneity within the colony in pathogen resistance, benefiting the colony in the prevention of disease propagation.

Acknowledgments

We thank A. Lenoir, T. Monnin, Xim Cerda and Raphaël Boulay for their help in collecting colonies in the field. This study was supported by the French Ministry of Research “Action concertée incitative jeunes chercheurs” (N° 5183) and the French Foreign Ministry “Picasso programme”.

Literature cited

- Adamo, S. A. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour*, **68**, 1443-1449.
- Bocher, A., Tirard, C. & Doums, C. 2007. Phenotypic plasticity of immune defence linked with foraging activity in the ant *Cataglyphis velox*. *J Evolution Biol*, **in press**.
- Cerdá, X. & Retana, J. 1997. Links between worker polymorphism and thermal biology in a thermophilic ant species. *Oikos*, **78**, 467-474.
- Dobrzanska, J. 1959. Studies of the division of labour in ants genus *Formica*. *Acta biol. exp.*, **19**, 57-81.
- Doums, C. & Schmid-Hempel, P. 2000. Immunocompetence in workers of a social insect, *Bombus terrestris* L., in relation to foraging activity and parasitic infection. *Canadian Journal of Zoology*, **78**, 1060-1066.
- Fefferman, N. H., Traniello, J. F. A., Rosengaus, R. B. & Calleri, D. V. 2007. Disease prevention and resistance in social insects: modelling the survival consequences of immunity, hygienic behavior, and colony organization. *Behav ecol sociobiol*, **61**, 565-577.
- Fitzgerald, L. 1988. Exercise and the immune system. *Immunology today*, **9**, 337-339.
- Fresneau, D. 1994. Biologie et comportement social d'une fourmi ponerine néotropicale (*Pachycondyla apicalis*). In: *Laboratoire d'Ethologie Expérimentale et Comparée URA 667*, pp. 331. Villetaneuse: Paris XIII.
- Gillespie, J., Kanost, M. R. & Trenczeck, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, **42**, 611-643.
- Gordon, D. M. 1987. Group-level dynamics in harvester ants: young colonies and the role of patrolling. *Anim. Behav.*, **35**, 833-843.
- Gordon, D. M. 1989. Dynamics of task switching in harvester ants. *Anim. Behav.*, **38**, 194-204.
- Gordon, D. M. 1996. The organization of work in social insect colonies. *Nature*, **380**, 121-124.
- Hart, A. G. & Ratnieks, F. L. W. 2001. Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Behav ecol sociobiol*, **49**, 387-392.
- Herbers, J. M. 1981. Time Resources and Laziness in Animals. *Oecologia*, **49**, 252-262.
- Herbers, J. M. & Cunningham, M. 1983. Social organisation of *Leptothorax Longispinosus* *Mayr. Anim Behav*, **31**, 759-771.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. 1990. *The Ants*. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University.
- Jaisson, P., Fresneau, D. & Lachaud, J.-P. 1988. Individual traits of social behavior in ants. In: *Interindividual Variability in Social Insects* (Ed. by Jeanne, R. L.), pp. 1-52. Boulder: Westview.
- Keller, L. 1995. Parasites, worker polymorphism, and queen number in social insects. *Am. Nat.*, **145**, 843-847.
- Kolmes, S. A. 1985. A Quantitative Study of the Division of Labour among Worker Honey Bees. *Z. Tierpsychol.*, **68**, 287-302.
- Kolmes, S. A. & Sommeijer, M. J. 1992. Ergonomics in stingless bees: changes in intra-nidal behavior after partial removal of storage pots and honey in *Melipona favosa* (Hym. Apidae, Meliponinae). *Ins. Soc.*, **39**, 215-232.

- König, C. & Schmid-Hempel, P. 1995. Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. *Proceedings of the Royal Society London B*, **260**, 225-227.
- Le Roux, A. M. & Le Roux, G. 1979. Activité et agressivité chez des ouvrières de *Myrmica laevinodis* nyl. (Hymenoptère, Formicidae). Modification en fonction du groupement et de l'expérience individuelle. *Ins. Soc.*, **26**, 354-363.
- Lenoir, A. 1979. Feeding behaviour in young societies of the ant *Tapinoma erraticum* L. : Trophallaxis and polyethism. *Ins. Soc.*, **26**, 19-37.
- Lenoir, A. 1987. Factors determining polyethism in social insects. *Experientia*, **54**, 219-241 (Suppl.).
- Lenoir, A. & Ataya, H. 1983. Polyéthisme et Répartition des Niveaux d'Activité chez la Fourmi *Lasius niger* L. *Z. Tierpsychol.*, **63**, 213-232.
- Loehle, C. 1995. Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations. *Ecology*, **76**, 326-335.
- Maistrello, L. & Sbrenna, G. 1996. Frequency of some behavioural patterns in colonies of *Kaloterme flavicollis* (Isoptera Kalotermitidae): the importance of social interactions and vibratory movements as mechanisms for social integration. *Ethol. Ecol. Evol.*, **8**, 365-375.
- Meudec, M. 1977. Le comportement de transport du couvain lors d'une perturbation du nid chez *Tapinoma erraticum* (Dolichoderinae). Rôle de l'individu. *Ins. Soc.*, **24**, 345-352.
- Miranda, J. T. & Vinson, S. B. 1981. Division of labor and specification of castes in the red imported fire ant *Solenopsis invicta* burm. *Anim Behav*, **29**, 410-420.
- Mollison, D. & Levin, S. A. 1995. Spatial dynamics of parasitism. In: *Ecology of Infectious Diseases In natural Populations* (Ed. by Grenfell, B. T. & Dobson, A. P.), pp. 384-398. Cambridge: Cambridge University Press.
- Müller, C. B., Blackburn, T. M. & Schmid-Hempel, P. 1996. Field evidence that host selection by conopid parasitoids is related to host body size. *Ins. Soc.*, **43**, 227-233.
- Naug, D. & Camazine, S. 2002. The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *Journal Of Theoretical Biology. Apr*, **215**, 427-439.
- O'Donnell, S. 1997. How parasites can promote the expression of social behaviour in their hosts. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, **264**, 689-694.
- Pie, M. R., Rosengaus, R. B. & Traniello, J. F. A. 2004. Nest architecture, activity pattern, worker density and the dynamics of disease transmission in social insects. *Journal of Theoretical Biology*, **226**, 45-51.
- Porter, S. D. & Tschinkel, W. R. 1985. Fire ant polymorphism: the ergonomics of brood production. *Behav ecol sociobiol*, **16**, 323-336.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, **86**, 248-249.
- Robinson, G. E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, **37**, 637-665.
- Roff, D. A. 1992. *The evolution of life histories. Theory and Analysis*. New York: Chapman & Hall.
- Rolff, J. & Siva-Jothy, M. T. 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science*, **301**, 472-475.
- Rosengaus, R. B. & Traniello, J. F. A. 2001. Disease susceptibility and the adaptive nature of colony demography in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis*. *Behavioral Ecology And Sociobiology. Nov*, **50**, 546-556.
- Saino, N. & Moller, A. P. 1996. Sexual ornamentation and immunocompetence in the barn swallow. *Behavioral Ecology*, **7**, 227-232.

- Schmid-Hempel, P. 1990. Reproductive competition and the evolution of work load in social insects. *American Naturalist*, **135**, 501-526.
- Schmid-Hempel, P. 1993. Transmission of a pathogen in *Bombus terrestris*, with a note on division of labour in social insects. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **33**, 319-327.
- Schmid-Hempel, P. 1998. *Parasites in social insects*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defense. *Annual Review of Entomology*, **50**, 529-551.
- Sheldon, B. C. & Verhulst, S. 1996. Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 317-321.
- Söderhäll, K. & Cerenius, L. 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinun in Immunology*, **10**, 23-28.
- Sorensen, A. A., Busch, T. M. & Vinson, S. B. 1984. Behavioral flexibility of temporal subcastes in the fire ant, *Solenopsis invicta* in response to food. *Psyche*, **91**, 319-332.
- Stearns, S. C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press.
- Tooby, J. 1982. Pathogens, polymorphism, and the evolution of sex. *J. Theor. Biol*, **97**, 557-576.
- Wilson, E. O. 1983. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta). III. Ergonomic resiliency in foraging by *A. cephalotes*. *Behav ecol sociobiol*, **14**, 47-54.
- Wilson, E. O. 1984. The relation between caste ratios and division of labor in the ant genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae). *Behav ecol sociobiol*, **16**, 89-98.

Table 1 Results of the general linear models for log(PO) and log(PPO) activities for intranidal workers. Non significant interactions ($P>0.1$) had been removed from the model.

Variable	Effect	F	Df	P
logPO	Colony	10.37	3, 221	< .00001
	Resting rate	1.42	1, 221	0.235
	Size	5.70	1, 221	0.018
logPPO	Colony	29.83	3, 188	< 0.0001
	Resting rate	1.72	1, 188	0.191
	Size	37.10	1, 188	< 0.0001

Figures legends

Fig. 1 Result of the hierarchical classification of workers according to their behaviour in colonies A, B and C during the first session of observation. In each group, the number of workers and the mean percent of time spent resting is indicated. The red points indicate the workers that became foragers in the second session.

Fig. 2 Result of the hierarchical classification of workers according to their behaviour in colonies A, B and C during the second session of observation. In each group, the number of workers (not including the foragers) and the mean percent of time spent resting is indicated. The red points indicate the foragers.

Fig. 3 Relationship between resting rate and tibia length (a), the rate of social interactions (b) the residuals of the regression of log (PO activity) with size (c), and the residuals of the regression of log (PPO activity) with size, for intra-nidal workers of colonies A (in purple), B (in green) and C (in blue) in the second session. In each colony, the linear regression line was indicated only when significant.

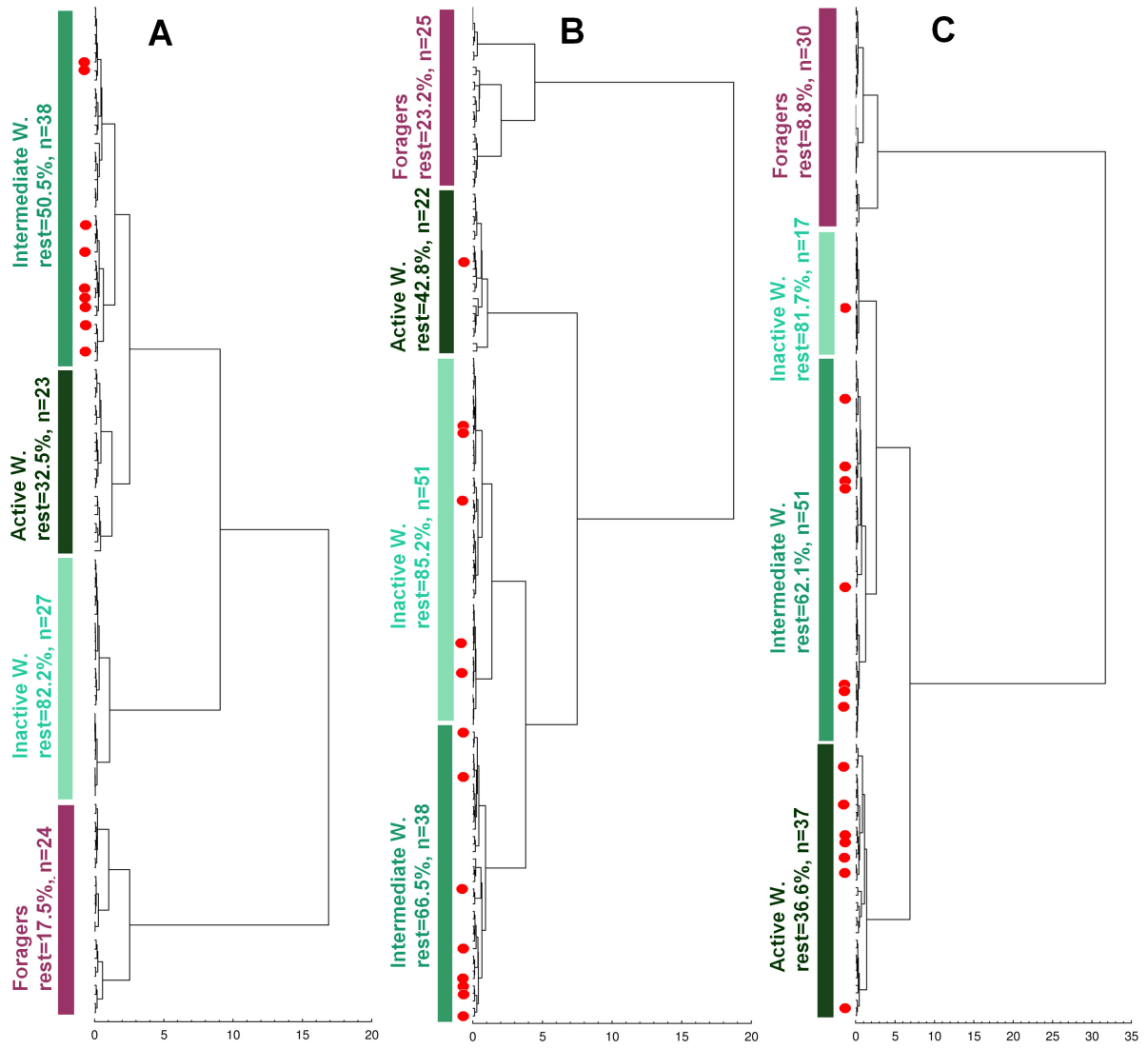


Fig 1

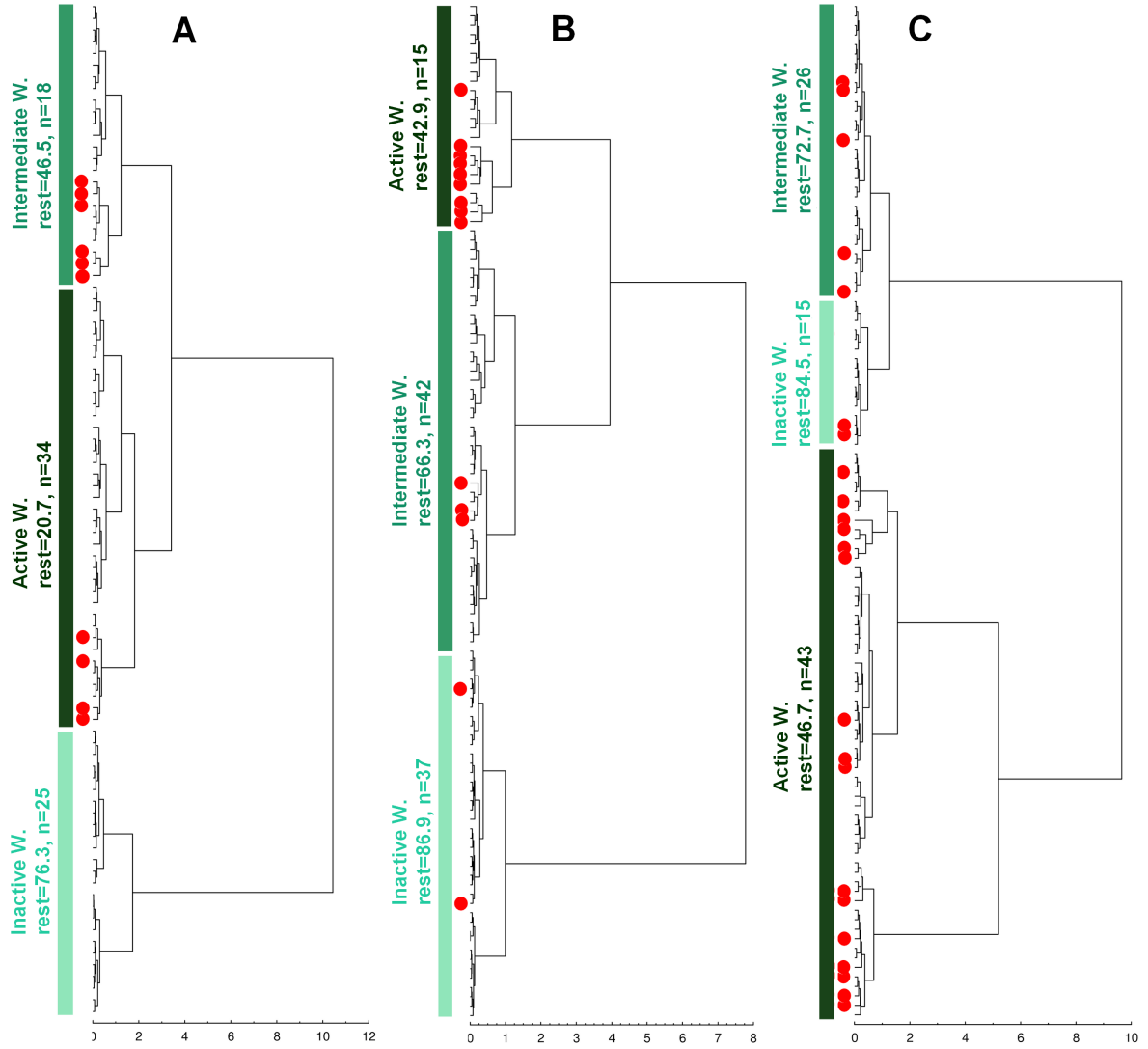


Fig 2

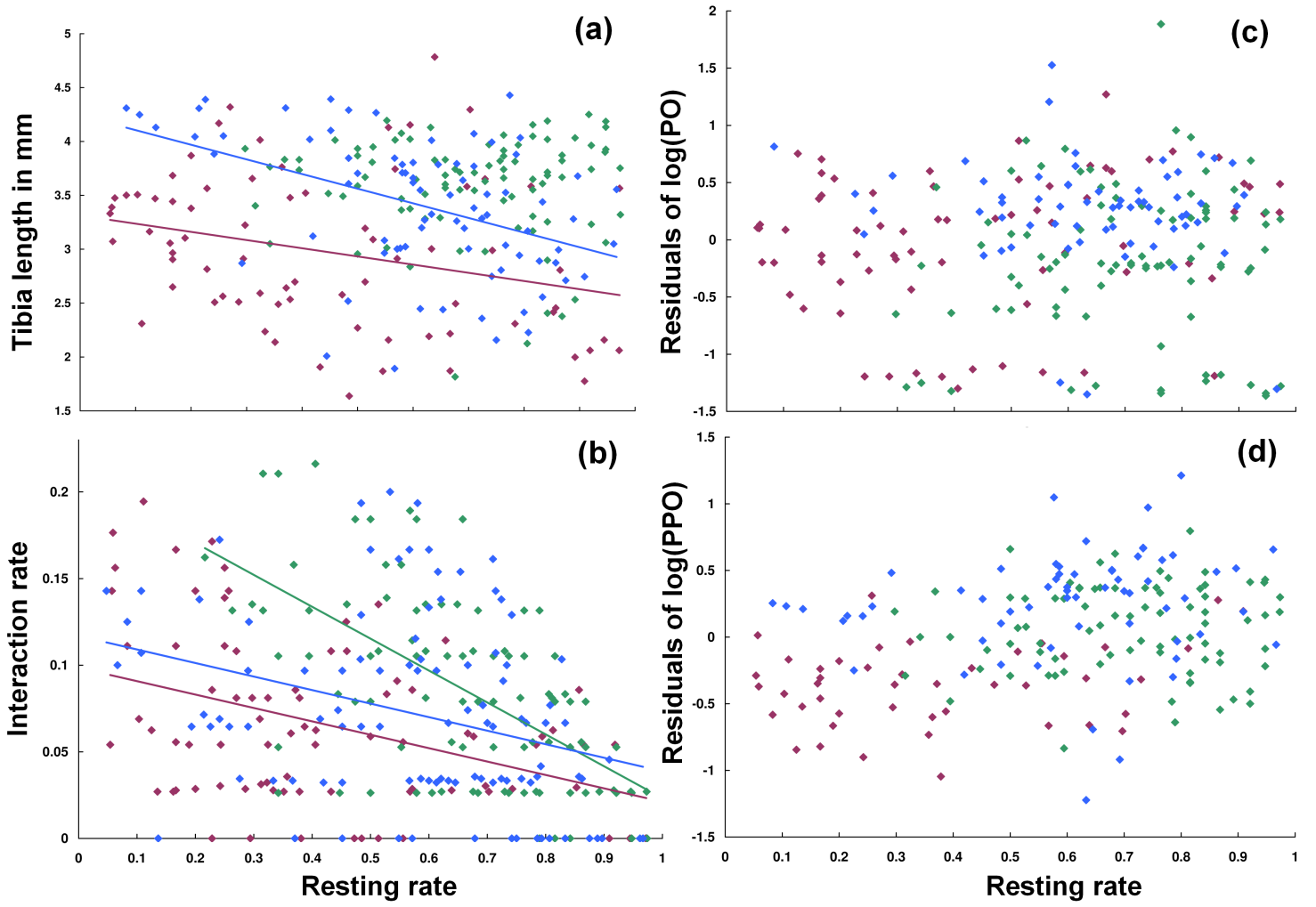


Fig. 3