

Origines et potentiel évolutif des intercastes chez la fourmi *Mystridium rogeri*

Sylvain Londe

► **To cite this version:**

Sylvain Londe. Origines et potentiel évolutif des intercastes chez la fourmi *Mystridium rogeri*. Evolution [q-bio.PE]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066320 . tel-01216781

HAL Id: tel-01216781

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01216781>

Submitted on 17 Oct 2015

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme (ED 227)

Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris

Origines et potentiel évolutif des intercastes chez la fourmi

Mystrium rogeri

Par Sylvain Londe

Thèse de doctorat de biologie et écologie

Dirigée par Mathieu Molet et Thibaud Monnin

Présentée et soutenue publiquement le 15 Octobre 2014

Devant un jury composé de :

| | | |
|-------------------------------|---|---------------------------|
| M. Abbadie, Luc | Professeur des universités, Ecole Normale Supérieure, Paris | Président |
| M. Molet, Mathieu | Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie, Paris | Directeur de Thèse |
| M. Monnin, Thibaud | Directeur de recherche, Université Pierre et Marie Curie, Paris | Directeur de Thèse |
| M. Heinze, Jürgen | Professeur, Universität Regensburg, Regensburg | Rapporteur |
| M. Nijhout, Frederik | Professeur, Duke University, Durham | Rapporteur |
| M. Fourcassié, Vincent | Chargé de recherches, Université Toulouse III, Paul Sabatier, Toulouse | Examineur |

Remerciements

Tout d'abord un grand merci à mes directeurs de thèse Mathieu Molet et Thibaud Monnin pour leur accompagnement scientifique, leur patience (souvent mise à l'épreuve) et leur implications tout au long de ses trois années de thèse. Je remercie tout particulièrement Mathieu pour ses exigences et ses encouragements, et Thibaud pour son éternelle sérénité et son soutien.

Je voudrais remercier Brian Fisher, Jean-Jacques Rafanomezantsoa, Chrislain Ranaivo, Clavier Randrianandrasana pour leur collaboration lors de la collecte des colonies de *Mystrium* sur le terrain, ainsi que Vincent Debat et Raphaël Cornette du MNHN pour leur implication lors des analyses morphométriques. Je remercie également Frederik Nijhout et Jürgen Heinze d'avoir accepté de prendre de leur temps pour participer à la critique de mon travail en tant que rapporteurs.

Merci à Martin, Marie et AnneC pour leurs relectures et leurs commentaires. Merci à Romain pour le soin qu'il a apporté aux colonies, merci à Claudia pour ses conseils. Merci à tous les collègues du labo (ou des labos environnants), parmi lesquels je citerais, au risque d'en oublier certains, Marie et Ewen (pour leur accompagnement technique dans les procédures administratives), Thomas (pour ses blagues parfois douteuses, mais souvent drôles), Florence, Alessandro, Anaïs, Marion, Céline, Mélissa, Julien, AnneC, Martin, Pierre Alain... pour leur présence, les discussions constructives et la bonne ambiance de travail (et de pauses) à laquelle ils ont tous contribué.

Merci aux stagiaires qui ont apporté leur aide dans les diverses manipulations de cette thèse, parmi lesquels, Hélène, Juliette, Pauline, et Brian.

Sommaire

| | |
|---|----|
| Remerciements..... | 3 |
| Sommaire..... | 5 |
| | |
| I- CONTEXTE GENERAL..... | 9 |
| Les origines de la variation en évolution..... | 9 |
| Les origines de la nouveauté en évolution..... | 13 |
| Evolution de nouvelles castes par recombinaison développementale..... | 17 |
| | |
| II-ORIGINES DEVELOPPEMENTALES DES INTERCASTES..... | 19 |
| Abstract | 20 |
| Introduction..... | 21 |
| Material and Methods..... | 25 |
| Collection | 25 |
| Digitalization | 26 |
| Queen-likeness index calculation | 26 |
| Reaction norms / variation norms..... | 28 |
| Allometry | 28 |
| Results | 29 |
| Queen-likeness indexes | 29 |
| Mosaicism | 29 |
| Shape of variation norms..... | 30 |
| Discussion | 30 |
| Tables..... | 40 |
| Acknowledgments | 40 |

| | |
|--|----|
| III- VARIABILITE COMPORTEMENTALE DES INTERCASTES..... | 41 |
| Introduction..... | 42 |
| Material and Methods..... | 44 |
| Biological material | 44 |
| Behavioral data | 45 |
| Multivariate analyses of location and task..... | 45 |
| Specialization calculation..... | 46 |
| Dominance scores..... | 46 |
| Gyne, worker and intercaste comparisons..... | 47 |
| Results | 47 |
| Behavioral profiles | 47 |
| Behavioral specialization | 48 |
| Dominance hierarchy..... | 48 |
| Discussion | 48 |
| Figures | 51 |
| Tables..... | 58 |
| Acknowledgments | 58 |
| Données complémentaires | 59 |
| | |
| IV- POTENTIEL EVOLUTIF DES PHENOTYPES INTERCASTES..... | 63 |
| Introduction..... | 63 |
| Matériel et méthodes..... | 64 |
| Matériel biologique | 64 |
| Tests d'accouplements | 65 |
| Suivi de la ponte d'une intercaste | 67 |
| Dissections | 67 |
| Résultats | 67 |
| Tests d'accouplements | 67 |

| | |
|--|----|
| Suivi de la ponte de l'intercaste accouplée et observations..... | 71 |
| Taille de la spermathèque, nombre d'ovarioles et d'oocytes..... | 71 |
| Discussion | 74 |
| | |
| V- DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES..... | 77 |
| Origine de la production d'intercastes..... | 77 |
| Coûts et bénéfices de la production d'intercastes..... | 79 |
| Potentiel évolutif des intercastes..... | 79 |
| Implications théoriques..... | 81 |
| Perspectives..... | 84 |
| Références | 87 |

I- CONTEXTE GENERAL

Le modèle d'évolution par recombinaison développementale

Les origines de la variation en évolution

La question de l'inné et de l'acquis est une problématique fondamentale en biologie et en évolution. Charles Darwin (1859) a pu proposer un modèle crédible d'évolution des organismes parce qu'il a distingué la part innée des déterminants biologiques, c'est-à-dire ceux qui sont hérités des parents par une transmission obligatoire, de ceux qui sont acquis à l'échelle individuelle et n'ont un effet que sur la génération présente. C'est en discriminant l'héréditaire du non héréditaire qu'on comprend que les variations dans le programme génétique vont être transmises de génération en génération, relativement à l'augmentation ou à la diminution du succès reproducteur qu'elles induisent chez les individus qui les portent. La théorie synthétique de l'évolution des années 1940 a ainsi formalisé la distinction entre les différents déterminants du phénotype d'un individu par la relation « $P = G + E$ ». Autrement dit, le phénotype (P) est le produit du développement de l'organisme suivant les instructions du génome (G) hérité de ses parents, dans un environnement donné (E) acquis par l'individu. Comme les déterminants génétiques et environnementaux varient d'un individu à l'autre, à l'échelle de la population, on peut dériver la formule ainsi : $\text{Var}(P) = \text{Var}(G) + \text{Var}(E)$ (Encart 1). Seule l'information génétique étant transmissible, seul l'apport de

variation génétique est susceptible d'être filtré par la sélection naturelle de génération en génération, et va de ce fait influencer l'évolution. La sélection stabilisante (c.-à-d. la contre-sélection des phénotypes trop éloignés de la valeur optimale pour un caractère donné) va se traduire soit par l'élimination des déterminants génétiques qui produisent des phénotypes inadaptés soit par le développement de mécanismes de canalisation génétique (cf. Encart 2) qui va rendre cette variation délétère silencieuse. L'environnement est alors plutôt considéré comme une source de bruit aléatoire vis-à-vis duquel le génome n'a de cesse d'augmenter la robustesse de ses programmes pour en atténuer les effets sur le phénotype. L'ensemble des mécanismes qui permettent au développement de résister à une partie de la variation environnementale pour produire des phénotypes stabilisés autour des valeurs de trait optimales est appelé la canalisation environnementale (Debat and David 2001) (Cf. Encart 2).

Décomposition de la variation phénotypique

$$Var(P) = Var(G_a) + Var(G_d) + Var(E) + Var(G \times E) + Var_{intra}$$

La variation d'origine génétique correspond à la variation induite par la diversité des génomes au sein d'une population. Elle se divise en deux composantes : une composante additive (G_a) correspondant à la partie héritable de la variation (héritabilité), et une composante de dominance (G_d), non héritable, qui correspond à l'interaction entre les différents allèles et les relations épistatiques entre locus. La variabilité génétique a pour source les différents processus de mutation aléatoire, duplication/insertion de fragments de génome, et de recombinaison (Barton and Keightley 2002; David and Samadi 2011).

Des individus génétiquement identiques produits dans des environnements différents aboutissent à des phénotypes différents. Cette variation est dite environnementale (E). Elle correspond à la plasticité phénotypique. Tous les génotypes n'ont pas la même sensibilité vis à vis de la variation de l'environnement et peuvent ainsi présenter des normes de réactions différentes. La variation entre les normes de réaction des différents génotypes correspond à l'interaction entre les variations génétiques et environnementales (GXE) (Debat and David 2001; Whitman and Agrawal 2009).

Les expérimentations en laboratoire montrent que même pour des lignées d'individus génétiquement identiques élevées dans des conditions environnementales contrôlées, il y a une variation phénotypique interindividuelle (Var_{intra}). Elle est issue de perturbations aléatoires affectant les processus physiologiques cellulaires, la communication entre cellules ou leurs taux de croissance, de division et d'élongation. Ce type de variation se traduit notamment par de l'asymétrie fluctuante (différences aléatoires entre le côté gauche et le côté droit des organismes bilatériens) (Møller and Swaddle 1997).

Encart 1.

Cependant, les avancées de la génétique évolutive du développement tendent à nuancer cette vision « génocentrique » et suggèrent que les facteurs environnementaux et développementaux peuvent avoir des implications importantes en évolution. En effet, les influences des gènes et de l'environnement sont inextricablement liées dans la production d'un phénotype par le biais du développement. Les effets conjoints des gènes et de l'environnement sont particulièrement évidents dans les cas de plasticité phénotypique. La plasticité phénotypique est la faculté d'un génotype à produire différents phénotypes en réponse à des facteurs environnementaux différents (Debat and David 2001; Whitman and Agrawal 2009). Plasticité phénotypique et dé-canalisation environnementale (l'inverse de la canalisation environnementale) sont donc des concepts interchangeables (Debat and David 2001). Il s'agit d'une caractéristique fondamentale du vivant qui se retrouve chez tous les organismes, du simple fait que l'ensemble des contraintes physiques et chimiques auxquelles sont confrontés les organismes au cours du développement affecte à des échelles variées les réactions moléculaires, les processus cellulaires et l'ontogénie des différents tissus (Sultan 1992). Au cours de l'évolution, cette plasticité, qui au départ n'est qu'un simple effet secondaire non adaptatif des processus biologiques a été assimilée au programme développemental des organismes en tant que réponse adaptative, par le biais d'une sensibilité des processus développementaux à des facteurs environnementaux spécifiques. Parmi les exemples classiques de plasticité phénotypique, on peut citer la capacité des végétaux à ajuster le développement du système aérien et racinaire en fonction de la disponibilité des ressources (Fig. 1.1) (Sultan and Bazzaz 1993; Sultan 2003), l'augmentation compensatoire de la taille du tube digestif en réponse à un appauvrissement de la qualité nutritive du milieu chez une espèce de criquet (Yang and Joern 1994), les différences saisonnières de patrons alaires de certaines espèces de papillons en réponse à la température de leur milieu (Windig 1994) et le développement des individus selon des castes morphologiques différentes chez les hyménoptères sociaux en fonction des conditions d'élevage des larves (Oster and Wilson 1978; Wheeler 1986). La plasticité phénotypique permet ainsi une adaptation à des environnements hétérogènes en leur associant des phénotypes alternatifs (Stearns 1989; Schlichting and Pigliucci 1998).

La plasticité phénotypique est susceptible d'influencer le cours de l'évolution des organismes de différentes façons. En permettant aux individus de s'adapter en une seule

génération elle va très fortement influencer leur capacité de survie lors de changements brutaux de l'environnement, et ce en fonction de l'intensité et de la direction (c.-à-d. la gamme des phénotypes produits) de la plasticité phénotypique (c.-à-d. le "Baldwin effect"; Baldwin 1896, 1902; Crispo 2007). D'autre part, comme elle permet de compenser les effets de la variation génétique par une réponse plastique adaptative, certains gènes vont être soumis à une pression de sélection relâchée, favorisant l'accumulation de variation génétique non exprimée (Sangster et al. 2004; Lahti et al. 2009; Van Dyken and Wade 2010). Cette variation génétique cryptique pourra alors être impliquée ultérieurement dans l'adaptation à de nouvelles conditions environnementales (Moczek 2008; Pfennig et al. 2010).

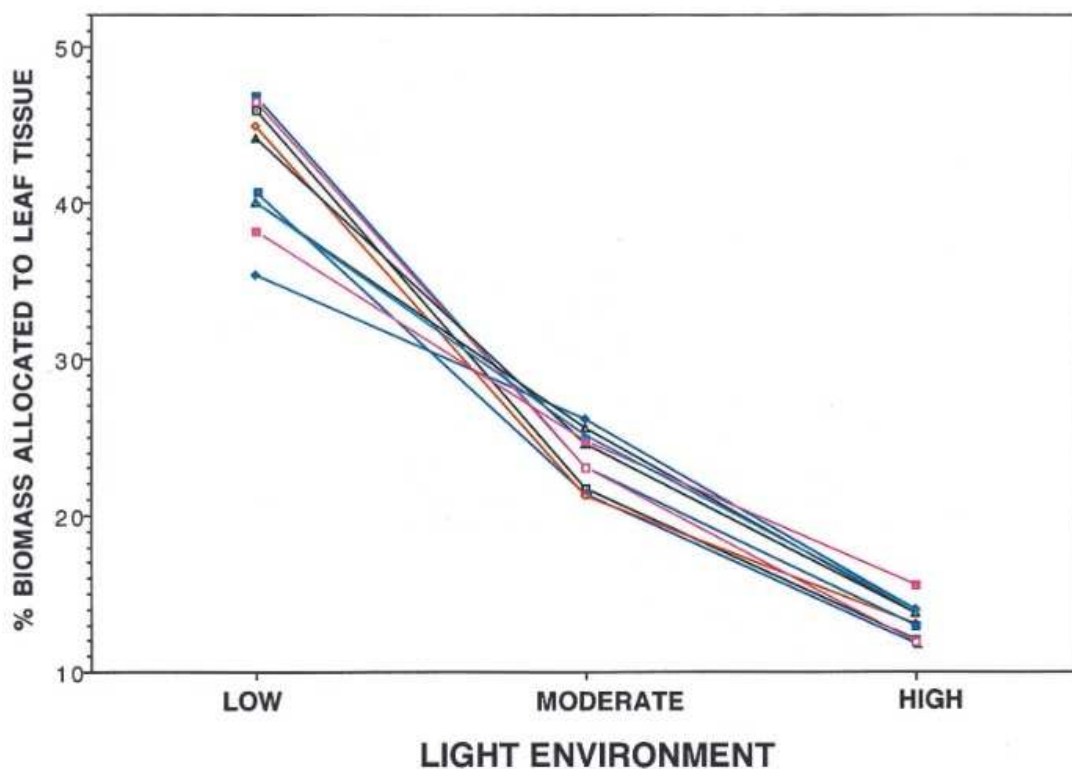


Figure 1.1 :Variation du phénotype (ici la proportion de biomasse allouée dans le feuillage relativement au reste de la plante) en fonction des conditions environnementales. La plasticité phénotypique est montrée ici pour 10 génotypes élevés sous serre dans trois traitements de luminosité. D'après Sultan et Bazzaz (1993).

L'influence des facteurs environnementaux dans le cours de l'évolution n'implique en aucun cas l'hérédité des caractères acquis. Elle est possible parce que la plasticité phénotypique repose sur des voies développementales comprenant des bases génétiques

qui peuvent répondre à la sélection. Ces bases génétiques sont particulièrement mises en évidence dans le phénomène d'assimilation génétique (Encart 2). Une découverte importante de Waddington (1942, 1953) montre en effet que, s'ils sont sélectionnés, certains traits induits par des facteurs environnementaux peuvent secondairement être assimilés dans le répertoire développemental des organismes. Au bout de quelques générations de sélection, ils peuvent être exprimés chez tous les individus, même en l'absence des facteurs environnementaux initiaux. Le mécanisme sous-jacent à ce type d'évolution est appelé assimilation génétique. L'explication de ce phénomène est que la perturbation environnementale a pour effet de faire s'exprimer dans le phénotype une partie de la variation génétique qui n'était pas exprimée dans les conditions initiales et ainsi de la soumettre à la sélection naturelle. Si la perturbation environnementale perdure assez longtemps pour qu'il y ait une sélection sur plusieurs générations, et que les nouveaux phénotypes associés sont bénéfiques, alors les allèles qui ont des effets quantitatifs conjoints sur la stabilisation de l'expression de ces nouveaux phénotypes vont être sélectionnés. Il s'agit en fait d'un réajustement de la canalisation autour d'une nouvelle valeur de trait. Des études ont par la suite donné d'autres exemples d'assimilation génétique et démontré son importance en évolution (Pigliucci et al. 2006; Suzuki and Nijhout 2006; Crispo 2007). De manière plus générale, cet ajustement de la canalisation autour de nouvelles valeurs de traits peut également accompagner la déstabilisation des phénotypes suite à des perturbations génétiques (p.ex. mutations). On parle alors d'accommodation génétique (Nijhout and Suzuki 2008; Suzuki and Nijhout 2008).

Les origines de la nouveauté en évolution

La définition de la nouveauté en évolution est une problématique difficile (Gould 2002). Comment concilier la notion de nouveauté, qui implique un aspect du phénotype qui n'était pas présent chez les ancêtres immédiats, avec un cadre théorique basé sur la descendance avec modification ? Où commence la nouveauté le long d'une série de modifications graduelles ? On aurait pu penser s'en sortir en écartant les caractères pour lesquels on trouve un état homologue chez les ancêtres. Cependant pour une innovation aussi évidente que les différents types d'yeux qui furent longtemps considérés comme des cas d'apparition indépendantes chez divers taxons (Land and Fernald 1992), on sait maintenant qu'ils sont tous issus de l'exploitation de gènes et de circuits de régulation déjà

présents chez un ancêtre commun (Gehring and Ikeo 1999). D'autres cas d'« homologues profondes » (cf. « deep homology concept » ; Shubin et al. 2009) concernant les membres des tétrapodes ou certains appendices chez les arthropodes (Prud'homme et al. 2011) montrent que l'évolution procède en recyclant le matériel issu des évolutions passées (Jacob 1977; Shubin et al. 2009; Moczek 2011). West-Eberhard (2003) parle alors d'évolution combinatoire pour décrire la réorganisation du phénotype, certaines parties pouvant être exprimées plusieurs fois au cours du développement ou perdues indépendamment du reste de l'organisme (Raff 1996). L'évolution combinatoire est rendue possible par la modularité des organismes.

Mise en évidence de l'assimilation génétique et de la canalisation

En exposant des larves de drosophiles à de hautes températures, Waddington (1942) observe l'apparition d'adultes présentant des anomalies alaires (caractère dit 'crossveinless' : discontinuité dans les nervures transversales). En sélectionnant ces individus pour les croiser entre eux et en soumettant les larves de leurs descendants aux mêmes conditions de hautes températures sur quelques générations, il obtient des individus qui présentent le caractère 'crossveinless' spontanément, sans que leurs larves aient été exposées à de fortes températures. Ces observations, qui ont d'abord rappelé l'hérédité des caractères acquis de Lamarck, s'interprètent en fait comme l'expression d'une variation cryptique initialement présente dans le pool génétique des lignées ancestrales, mais qui était restée inexprimée avant la phase de sélection. Au début de l'expérience, les individus qui présentent des anomalies alaires en réponse au stress environnemental, sont porteurs d'allèles ayant tendance à affecter les ailes. Mais ces allèles, séparément, ne peuvent pas s'exprimer sans l'intervention d'un stress déstabilisant le paysage épigénétique global. La sélection de ces individus va alors induire la concentration de tels allèles dans le génome ainsi qu'une modification des systèmes de régulation du développement qui y sont associés jusqu'à la fixation du caractère (Waddington, 1953). On parle alors d'assimilation génétique. La canalisation génétique correspond à la propriété de résistance du développement à une partie de la variation génétique avant sa fixation par assimilation génétique. De manière symétrique on désigne par « canalisation environnementale » l'ensemble des mécanismes qui permettent au développement de produire des phénotypes constants en dépit des variations environnementales (Debat et David, 2001).

Encart 2.

La modularité correspond à la discontinuité des liens qui associent différentes sous parties du phénotype, et se traduit par une compartimentation de l'organisme (Wagner 1995b). Un module est une sous unité du phénotype dont les parties co-varient plus fortement entre elles qu'elles ne co-varient avec les parties des autres modules (Klingenberg 2008). Par exemple les dimensions d'une aile d'insecte sont étroitement corrélées alors

qu'elles sont relativement indépendantes des dimensions des pattes. Les modules sont associés à une évolution semi-indépendante, souvent en relation avec les fonctions pour lesquelles ils sont sélectionnés. Ainsi, la forme des ailes et des pattes étant soumise à des pressions de sélection indépendantes, les morphologies des deux appendices vont évoluer de manière relativement indépendante. L'ontogénie de chaque module étant régulée par des groupes de gènes et des relations épistasiques indépendantes, la modification des réseaux de régulation peut entraîner une réorganisation majeure des sous-unités du phénotype (West-Eberhard 2003).

Mary Jane West-Eberhard (2003, 2005a) a proposé un modèle d'évolution impliquant à la fois la modularité des organismes et la plasticité phénotypique. Il s'agit du modèle d'évolution par recombinaison développementale, selon lequel des nouveaux phénotypes ont pour origine la réorganisation des phénotypes ancestraux suivie par une stabilisation du changement par accommodation génétique. Une particularité majeure de la recombinaison développementale est que la réorganisation du phénotype peut aussi bien être initiée par un apport de variation génétique (p.ex. mutations affectant les gènes architectes du développement) que par un apport de variation environnementale initiant une réponse plastique. On peut résumer l'évolution d'un nouveau phénotype par recombinaison développementale résultant d'une induction environnementale en différentes étapes : (i) On a initialement une population d'individus qui varient dans leur sensibilité aux facteurs environnementaux mais dont la variabilité ne se traduit pas phénotypiquement soit parce que les conditions environnementales qui pourraient induire ces changements ne se produisent pas, soit parce que la canalisation stabilise les phénotypes. (ii) Des changements environnementaux suffisamment importants pour rompre la canalisation entraînent l'expression de cette variabilité au niveau phénotypique. En fonction de la plasticité phénotypique des différents individus de la population, certains modules présentent alors des modifications majeures. Contrairement à des mutations affectant des gènes structuraux qui se traduisent par des effets aléatoires, les modifications occasionnées par la plasticité phénotypique sont beaucoup plus enclines à produire des variants favorables car elles reflètent des voies développementales impliquées dans des adaptations passées chez les génotypes ancestraux. (iii) Les nouveaux phénotypes produits sont soumis à la sélection naturelle. Le nombre de variants phénotypiques peut être relativement important étant

donné que toute la population est soumise au changement environnemental. De ce fait des phénotypes favorables ont beaucoup plus de chance d'augmenter en fréquence suite à l'action de la sélection car ils sont moins sensibles à la dérive génétique qui peut occasionner la perte d'une mutation, même très favorable, en raison du très petit nombre de mutants initiaux. La stabilisation du nouveau phénotype résulte alors de l'assimilation génétique qui va réajuster la chronologie et les différents seuils de réponses impliqués au cours du développement (West-Eberhard 2003, 2005a).

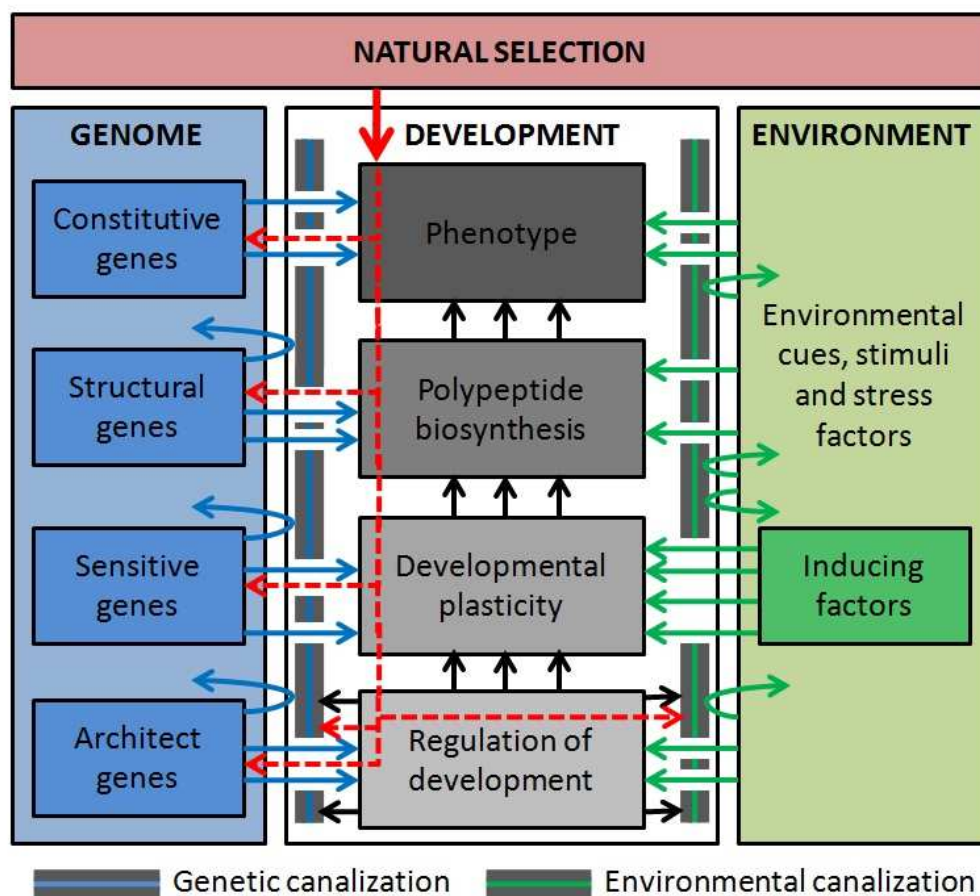


Figure 1.2 : Résumé des interactions entre développement, génome et environnement. La canalisation génétique et environnementale permet de protéger le développement d'une partie des variations génétiques et environnementales ayant des effets délétères. Les gènes architectes régulent les mécanismes de canalisation et organisent l'expression d'autres gènes de plus haut niveau. Les gènes sensibles aux facteurs environnementaux ajustent l'expression des gènes structuraux, qui synthétisent les éléments constitutifs du phénotype. La sélection agit de manière directe sur les phénotypes, et indirectement sur l'ensemble du génome, par le biais de sa transmission différentielle de génération en génération. Les facteurs environnementaux induisent des variations phénotypiques par le biais desquelles la sensibilité du développement se trouve elle-même sous sélection.

Evolution de nouvelles castes par recombinaison développementale

Le modèle d'évolution par recombinaison développementale a ensuite été proposé par Molet et al. (2012) comme étant un mécanisme évolutif jouant un rôle prépondérant dans l'évolution de nouvelles castes chez les fourmis.

Les fourmis sont remarquables de par la diversité et la complexité de leurs systèmes de castes. Ainsi, au sein d'une même espèce, à partir d'un même génotype, la plasticité phénotypique permet le développement des larves selon des voies alternatives distinctes aboutissant à des morphologies, des comportements et des fonctions extrêmement variés (Wilson 1971; Brian 1980). On appelle polyphénisme la faculté à produire des phénotypes alternatifs discrets en fonction des conditions environnementales. Le cas le plus répandu est la spécialisation en deux castes : des individus reproducteurs avec des ailes – les reines –, et des individus non reproducteurs aptères – les ouvrières – (Oster and Wilson 1978). Ce système de castes est associé au mode de « fondation indépendante ». Les jeunes reines (gynes) quittent le nid, sont fécondées pendant l'essaimage (vol nuptial), dispersent, puis fondent seules les nouvelles colonies. Ce mode de fondation est considéré comme étant un caractère ancestral chez les fourmis étant donné que les fourmis ont évolué à partir de guêpes solitaires chez qui la dispersion se fait par le vol (Peeters and Molet 2010).

Il existe cependant de nombreuses espèces présentant des castes supplémentaires ou alternatives. C'est le cas des soldats, (caste d'individus non reproducteurs) et des reines ergatoïdes, qui sont des reproductrices aptères, associées au mode de fondation par fission coloniale. La dispersion des reines se fait alors au sol (pas d'essaimage) par fission de la colonie mère (Holldobler and Bartz 1985; Cherix et al. 1991; Peeters and Molet 2010).

Molet et al. (2012) ont montré qu'il est possible d'interpréter la morphologie des reines ergatoïdes et des soldats comme des mosaïques de caractères de type reine et ouvrière. En effet une reine ergatoïde peut être considérée comme un individu présentant un appareil reproducteur fonctionnel de type reine associé à un thorax d'individu aptère de type ouvrière. De même, un soldat peut être considéré comme un individu présentant des caractères de reines (taille, développement de la tête) et un appareil reproducteur stérile de type ouvrière. De plus, il se trouve que certaines anomalies décrites chez les fourmis, appelées intercastes, correspondent également à des morphologies mosaïques entre reines

et ouvrières (Plateaux 1970; Peeters 1991b). En partant de ce constat, Molet et al. (2012) ont proposé que des nouvelles castes comme les reines ergatoïdes aient pu évoluer par recombinaison développementale à partir des intercastes qui réassocient des parties reines des parties ouvrières suite à des inductions environnementales.

La plausibilité de ce modèle d'évolution de nouvelles castes par recombinaison développementale chez les fourmis sera évaluée en cherchant à apporter des éléments de réponses correspondant à trois grands axes de travail :

I- Détermination de l'origine développementale des intercastes. Dans cette partie, il s'agira de déterminer si les intercastes sont bien des phénotypes mosaïques qui recombinent des parties reine et ouvrières, en quoi cette recombinaison phénotypique est associée au polyphénisme reine/ouvrière, et quels sont les facteurs qui peuvent induire cette production.

II- Evaluation des coûts et bénéfices de la production d'intercastes pour les colonies. Du fait du manque de données concernant le comportement des intercastes chez les fourmis, nous n'avons aucune idée de l'effet de leur production sur le succès des colonies. La sélection opérant à l'échelle de la colonie chez les fourmis, il est essentiel d'étudier les profils comportementaux des intercastes au sein des colonies pour savoir si la production d'intercastes est susceptible d'être sélectionnée. La prédiction qui découle des analyses théoriques de West-Eberhard (2005a) et Molet et al. (2012) est que les comportements des intercastes produits par plasticité phénotypique ont plus de chance d'être fonctionnels que le seraient ceux présentés par des individus issus de variants génétiques.

III- Quel est le potentiel évolutif des phénotypes intercastes. Dans cette partie nous étudierons les liens entre les phénotypes des intercastes et ceux des reines ergatoïdes qui ont évolué à de nombreuses reprises de manière indépendante chez les fourmis. Ceci nous amènera à établir la plausibilité d'évolution des reines ergatoïdes à partir de la production d'intercastes selon le mode d'évolution par recombinaison développementale proposé par West-Eberhard (West-Eberhard 2005a) et Molet et al. (2012).

II- ORIGINES DEVELOPPEMENTALES DES INTERCASTES

Plasticity and modularity allow for the production of novelmosaic phenotypes in ants

Cette partie correspond à un article en soumission (Evolution), coécrit par les auteurs suivants :

Sylvain Londe¹, Thibaud Monnin¹, Raphaël Cornette², Vincent Debat², Brian L. Fisher³ and Mathieu Molet¹

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR CNRS 7618 Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris, France

2 Muséum National d'Histoire Naturelle; UMR CNRS 7205 ISyEB, Département Systématique et Évolution, Paris, France

3 Department of Entomology, California Academy of Sciences, Golden Gate Park, 55 Music Concourse Drive, San Francisco, California 94118, USA

Keywords: queen, intercaste, phenotypic recombination, caste evolution.

Abstract

Despite the evidence that many qualitative shifts have occurred during evolution, the origin of discrete novelty remains poorly understood. Some authors proposed that novelty may involve recombination of modules from alternative phenotypes. Using a new morphometric procedure, we tested the hypothesis that some anomalous individuals in ants are mosaic phenotypes recombining queen-like and worker-like modules. We then explored the developmental processes generating mosaicism by computing the variation norm (a proxy of reaction norm) of each module. We found that intercastes are more mosaic than workers and queens, but there is no discontinuity between workers and intercastes. Intercastes are always more queens-like for head, legs and gaster than for thoracic modules, suggesting that the possible combinations are strongly restricted. We found that distinct modules exhibited distinct variation norms. We conclude that intercastes are generated by intermediate levels of environmental factors inducing differential responses among modules. The mosaic pattern is in line with the morphology of wingless queens of congeneric species. Our results therefore suggest that intercastes are mosaics that may be at the origin of the evolution of novel castes. Thus, polyphenism and modularity may facilitate morphological innovation by allowing combinatorial evolution at phenotypic scale.

Introduction

Darwinian theory and subsequent developments of populational thinking of the modern synthesis, have led to a good understanding of gradual adaptation for quantitative traits, which is seen as a change in the allelic frequency distribution under selection. Nonetheless, the origin of discrete novelty remains poorly understood despite the evidence that many qualitative shifts have occurred during evolution (Moczek 2008). Numerous examples suggest that such novelties evolved by re-using previously existing structures or developmental pathways. Research on homeotic genes has shown that novel phenotypes can result from the reorganization of existing ones (Lewis 1963; Gehring and Hiromi 1986). Important novelty including animal eyes and tetrapod limbs also evolved through modifications of complex regulatory circuits already present in ancestors (“deep homology”, Shubin et al. 2009). Such examples of evolutionary tinkering (Jacob 1977; Duboule and Wilkins 1998) show that natural selection acts by modifying structures that are already available. West-Eberhard (2003) and Molet *et al.* (2012) go further by suggesting that evolutionary novelty may also result from the recombination of alternative phenotypes (i.e. phenotypic recombination). Indeed, some new castes in ants, such as wingless queens and soldiers, are mosaics of winged queen and worker morphologies (Molet et al. 2012, 2014). Therefore, Molet et al. (2012) proposed that these new castes may have evolved by phenotypic recombination. This model of combinatorial evolution is based on the association of two widespread characteristics of living organisms: modularity and plasticity.

Modularity is a universal property of organisms resulting from the branching nature of development (Wagner 1995a; West-Eberhard 2003). Modules are units, the parts of which are strongly integrated by numerous genetic, developmental or functional interactions (Breuker et al. 2006), but are weakly connected to other modules (Klingenberg 2008). Because traits that belong to one module experience the same developmental, genetic or functional constraints, they co-evolve semi-independently from traits of others modules (West-Eberhard 2003; Klingenberg 2008). For instance, modularity allowed birds and bats to evolve fore-limbs that dramatically differ from hind-limbs. A consequence of this “discontinuity” is that highly modular subunits, such as arthropod imaginal discs, can develop numerous times along the body plan or be deleted independently of others traits (Lewis 1963; Morata and Garcia-Bellido 1976; Morata and Lawrence 1979). This property

allows for the reorganization of different phenotypic building blocks i.e. combinatorial evolution (West-Eberhard 2003).

Phenotypic plasticity is the ability of a single genotype to produce alternative phenotypes in response to different environmental factors (Debat and David 2001; Whitman and Agrawal 2009). Continuous variation resulting from environmental factors is called a reaction norm while discrete variation is classified as polyphenism (Stearns 1989). Consequences of plasticity on evolvability are controversial. Some authors consider that plasticity buffers the effect of selection and thus impedes evolutionary changes, because it allows individuals to reach the fitness optima without genetics changes (Price et al. 2003; Schlichting 2004). Others suggest that this buffering against selection increases evolvability because it promotes the accumulation of cryptic genetic variation that may later be fixed by genetic accommodation following environmental changes (Waddington 1953; Price et al. 2003; West-Eberhard 2003; Pfennig et al. 2010).

One of the most extreme examples of phenotypic plasticity is polyphenic taxa with discrete alternative phenotypes. Typically, in social insects with queen and worker, caste determination is environmental (Wheeler 1986, 1991). Environmental factors (e.g. food supply) induce caste-determining signals that drive the development toward alternative phenotypes according to some threshold responses. These alternative phenotypes are both encapsulated in the developmental potential of an embryo, and an egg contains the genetic information required to produce all queen and worker modules. This may facilitate combinatorial evolution by increasing the number of distinct modules available for phenotypic recombination.

Ants are a highly diversified clade with various morphological castes (Hölldobler 1990; Wilson 1990; AntWeb 2014). We suspect phenotypic recombination to have played a role in such diversification. Ants are likely prone to evolving by phenotypic recombination because they associate a polyphenism (queen and worker castes) with a high modularity typical of arthropods. The ancestral and most common caste system features winged queens that perform aerial dispersal and reproduction, and wingless workers that are involved in brood care, foraging, defense, cleaning and construction of the nest. Accordingly, queens have a fully functional reproductive system with a spermatheca, a large articulated thorax

with flight sclerites and large wing muscles, and three ocelli. In contrast, workers have an atrophied reproductive system, a reduced fused thorax lacking wings and flight muscles, and generally no ocelli (Wilson 1971). This ancestral caste system is associated with independent colony foundation, where queens disperse by flight and found new colonies alone (e.g. Peeters and Molet 2010). A derived strategy that evolved independently in many genera is dependent colony foundation (i.e. fission or budding) (e.g. Cronin et al. 2013), where queens disperse on foot together with many nestmate workers. This strategy involves important morphological adaptations, including permanently wingless queens called ergatoid queens in many species (Heinze and Tsuji 1995; Heinze and Keller 2000; Peeters and Ito 2001; Peeters and Molet 2010; Cronin et al. 2013). Molet et al. (2012) have shown that ergatoid queens are mosaics of winged queen and worker morphologies and proposed that they may have evolved by phenotypic recombination. However, the question of the early step of this evolution by recombination remains to be explored: what are the variants that can be selected for and what developmental mechanisms allow their production?

Despite the discrete queen/worker dichotomy, some authors have described individuals that are neither queens nor workers and are called intercastes (Plateaux 1970; Peeters 1991b). Intercastes are rare anomalous adults with various morphologies, visually ranging from almost similar to winged queens to almost similar to workers. Although they are generally not winged, they often have simplified flight sclerites and sometimes wing stubs. They may have a spermatheca and one or several ocelli. Thus, intercastes seem to be mosaic phenotypes recombining queen-like and worker-like traits. They have been described in about 20 species (see Peeters, 1991b for references) and they are likely to be taxonomically widespread. Indeed, they are probably usually either unnoticed due to their rarity or discarded by researchers because of their abnormality. Because some intercastes look morphologically similar to ergatoid queens, we suggest that they may represent the early step of the evolution of ergatoid queens. The production of random mosaic variants would thus be the starting point for the evolution by phenotypic recombination, before selection fixes a specific phenotype, leading to the evolution of a new caste. Accordingly, studying intercastes will contribute to our understanding of caste evolution.

The intuitive concept of mosaic has allowed for the description of intercastes based on discrete traits (Plateaux 1970; Peeters 1991b; Düsselmann et al. 1996; Okada et al. 2013).

Nevertheless, no quantitative measures of mosaicism have been performed, and consequently phenotypes with limited mosaicism have probably never been described. However, a continuous range of mosaic phenotypes could exist. Therefore, we first propose a new procedure based on morphometric data to quantify mosaicism. We used this procedure to describe the range of recombination among queen and worker modules and to assess mosaicism level of each individual. We test whether individuals initially classified as intercastes based on discrete characters are also mosaics for quantitative morphometric traits. We then explore the developmental processes generating intercastes. Disruptions in the process of caste determination may be caused by two alternative mechanisms: an abnormal level of environmental factors or an alteration of threshold responses to caste-determining signals (Fig. 2.1). In the first case, mosaicism would result from subtle differences in the shape of the reaction norms among modules. Intermediate levels of environmental factors would lead to different levels of queen-likeness among modules according to the shape of their relative reaction norms (Fig. 2.1.a). In the second case, mosaicism would be caused by alterations of the response thresholds involved in the development of some modules but not others. As a consequence, such altered modules would not fit the typical reaction norm found in normal queen and worker castes (Fig. 2.1.b). The first hypothesis has three corollaries: (1) There are significant shape differences among the reaction norms of distinct modules. For intermediate levels of environmental factors, the developmental response is not the same for all modules; (2) For a given level of environmental factors, mosaicism level is related to the differences among reaction norms. In the theoretical case depicted in figure 1.b, we expect a continuous range of mosaics. With increasing level of environmental factor, mosaicism first increases as reaction norms diverge and then decreases as reaction norms converge; (3) Relative shapes among reaction norms highly constraint possible mosaic combinations. Intercastes cannot recombine queen and worker modules randomly. For a given level of environmental factors, they necessarily are worker-like for modules that have a low developmental response and queen-like for modules that have a high developmental response. None of these statements is predicted by the second hypothesis, hence validating one or several of them would yield support to the first hypothesis. Conversely, disproof of at least one of the corollaries would invalidate the first hypothesis. We used geometric morphometrics to quantify mosaicism in *Mystrium*

rogeri, and test these three statements to conclude about the developmental processes generating intercastes.

Material and Methods

Collection

We collected 60 colonies of *Mystrium rogeri* in a rainforest in Andrambovato, Madagascar, in November 2011 and January 2013. Each colony contained an average of 6.1 (± 4.2) queens, 40.4 (± 20.5) workers and 15 (± 10.4) males. Out of these 60 colonies, 19 colonies (31 %) had 2.4 (± 1.2) intercastes. In total 1.6 % of females were intercastes. Since a morphometric analysis of all individuals was technically not possible, we focused on three colonies where several intercastes were present (16 queens, 19 intercastes and 100 workers from colony #637, #654 and #647). In addition, to increase our sample of intercastes, we also included other intercastes ($n=18$) found in 10 out of the remaining 57 colonies. To control for colony effect, we added to each intercaste a worker and a queen (when available) from the same colony. Our final sample thus consisted of 29 queens, 37 intercastes and 124 workers (Table 2.1).

Because intercastes fill in a morphological continuum that spreads between winged queens and workers, we set criteria to decide whether to categorize individuals as intercastes instead of workers or queens. Thus, we used discrete characters visible under a stereomicroscope. Winged queens of *M. rogeri* have three ocelli that are lacking in workers. Consequently, individuals were classified as intercastes if (1) they had one ocellus, two ocelli, or three reduced ocelli or (2) they were wingless but had wing stubs or relatively unfused flight sclerites.

We worked on the shapes of the head capsule, pronotum, mesonotum and propodeum, on the mean length of the two hind leg tibiae, and on the width of the gaster. We used geometric morphometrics in order to extract 2D shape information on four modules (head capsule and three thoracic segments) and linear morphometrics on two modules (tibia length and gaster width). These structures are relevant for our investigation because they are rigid, unarticulated, and dimorphic between winged queens and workers (Fig. 2.2).

Digitalization

Polyphenism induces large shape differences between castes, so finding numerous homologous anatomical landmarks is not possible. Therefore we used outlines and semi-landmarks methods (Bookstein 1997). Regarding head shape, we defined two sets of semi-landmarks along the edges of the head capsule and clypeus in dorsal view. Regarding thorax shape, we digitalized one set of semi-landmarks along the edges in dorsal view. The thoracic configuration was then split into three partial configurations: pronotum, mesonotum and propodeum (Fig. 2.2c).

We used TPSDig2 software for digitalization (Rohlf 2009). Each structure was photographed and digitalized twice to take into account small deviations caused by optical biases such as lighting variation or position relative to camera lens (Claude 2008). Measurement error was computed using Procrustes ANOVA (Klingenberg et al. 1998).

For each individual, we calculated an average configuration based on the two sessions. We focused our analysis on symmetrical variance. Thus we reflected lateral semi-landmark configurations across the symmetry axes using the “object symmetry” procedure (Klingenberg et al. 2002). The shape component of each configuration was extracted using the Procrustes superimposition method (Smith et al. 1997; see also Auffray et al. 1996). All structures were first rescaled with their own unitary centroid size in order to extract shape information. Rescaled configurations were then superimposed and rotated around their centroid so as to minimize the sum of squared distances between corresponding semi-landmarks (implementation in R with function of Claude, 2008).

Queen-likeness index calculation

To assess mosaicism, we first computed a queen-likeness index quantifying how similar each module was to typical queen or worker module. The 1D legs length and gaster width directly gave the relative position of all individuals on an axis from worker to queen morphologies. The 2D shapes for the other modules required a reduction of dimensionality. For each of these modules, a queen/worker axis was first constructed using queen and worker data, and intercaste data were then projected on it. The queen/worker axis was computed using Between Group Analysis (BGA) (Culhane et al. 2002; see also Dolédec and

Chessel, 1987). When a sample can be dissociated into N groups, BGA generates N-1 axes using an orthogonal transformation that maximizes between group variances. Hence, we projected all individuals on the eigenvector that had been computed from the co-variance matrices of the centroids of queen and worker groups. Individual position values were then shifted and rescaled in order to obtain a homogeneous queen-likeness index for each module, from “0” for the most worker-like morphology to “1” for the most queen-like morphology. Shifting consisted in subtracting the smallest position value from each position and rescaling consisted in dividing all positions by the largest value. Thus each value V was transformed as $V' = (V - V_{\min}) / V_{\max}$.

Two more common alternative methods to compute the queen/worker axis were rejected. The first axis of a Principal Component Analysis is not suitable because it does not maximize variance between queens and workers. The first component of a Linear or Quadratic Discriminant Analysis maximizes the discrimination between queens and workers, but it also dramatically distorts the intra-group variances by transforming relations among initial variables (Fukunaga 1990). This could have biased the among-groups measure of mosaicism since our mosaicism estimator is the variance among queen-likeness indexes of each module within individuals.

Mosaicism must quantify, in a single individual, the level of morphological recombination of modules normally occurring in distinct individuals (either in a queen or in a worker). For instance, an individual with a queen-like head and a worker-like pronotum would be considered a mosaic. Therefore, we computed mosaicism as the standard error of queen-likeness index values for the six modules, i.e. the dispersion of queen-likeness index values among modules. We compared the average mosaicism in queens, workers, and intercastes using Kruskal-Wallis tests. In order to test whether mosaicism patterns were not caused by the queen-likeness index calculation method, we re-calculated mosaicism after inter-individual permutation of queen-likeness index for each module. If actual mosaicism patterns were preserved despite permutation, we would conclude that it was caused by the mosaicism computation method. Conversely, a disruption of mosaicism pattern following the permutations would confirm its biological significance. Slope significance for queens, intercastes and workers were tested by bootstrap procedure (1000 samples).

Reaction norms / variation norms

Testing our hypotheses requires investigating the shape of the reaction norms of different modules. A reaction norm describes the range of phenotypes that a genotype can produce when exposed to a range of environments (Johansen 1909; Schmalhausen 1949; Gomulkiewicz and Kirkpatrick 1992). It is visualized by plotting the phenotype against an environmental variable. The environmental variable is not directly available in ants because larvae cannot be isolated nor controlled during their development as they heavily depend on adult care. However caste determination is known to be environmental in most species (Wilson 1971; Wheeler 1986, 1991), so we can use the global queen-likeness of individuals as a correlate of environmental factors driving caste determination. Accordingly, we used global queen-likeness (the average queen-likeness index values for the six modules) as the abscissa of reaction norms. Nevertheless, global queen-likeness may also depend on genetic variations among individuals, so the functions that we obtained were not reaction norms *strict sensu* but rather “variation norms”.

In order to compare the shapes of variation norms, we extracted for each module the abscissa of the inflection point of a fitted logistic function and the slope at this inflection point. We tested differences between these parameters using a student test on distributions generated from a bootstrap procedure (1000 samples).

Allometry

We computed allometric relationships between queen-likeness index values for each module and we log-transformed the centroid sizes extracted from the Procrustes procedure. Allometric coefficients were calculated for each group separately as advocated by Klingenberg (1996). We used standardized major axis regression in order to take into account errors in both queen-likeness index values and size measurements (Fairbairn 1997). Slope significance and slope differences among groups were tested by bootstrap procedure (1000 samples) (Klingenberg 1996).

Results

Queen-likeness indexes

Procrustes ANOVA showed that measurement errors accounted for less than 12% of inter-individual variation (11.4% for head shape, 0.4% for pronotum shape, 2.1% for mesonotum shape, 4.5% for propodeum shape, 10.1% for leg length and 2.2% for gaster width), and were therefore negligible.

Queen-likeness was significantly different for queens and workers for each module, with an overlap for head, legs and gaster (Fig. 2.3). Intercastes queen-likeness was different from and intermediate between queens and workers ($P < 1.0^{-6}$), except for legs that did not differ from queens ($\text{Chi}^2 = 0.09$, $P = 0.76$). The three thoracic modules of intercastes were more similar to workers than to queens and they overlapped with workers (Fig. 2.3). Workers were significantly more variable than queens and intercastes ($P < 1.0^{-6}$) except for pronotum (queens/workers: K-squared = 0.75, $P = 0.39$; intercastes/workers: K-squared = 1.95, $P = 0.16$) and mesonotum (queens/workers: K-squared = 0, $P = 0.98$).

Queen-likeness indexes were tested for allometric effect on log-transformed centroid sizes of the corresponding modules. For all modules, queen-likeness indexes showed no significant allometric effect for queens but strong and significantly different allometries for workers and intercastes. The differences of allometric relationships among groups prevented a global correction in order to extract size-independent shape information (Klingenberg 1996).

Mosaicism

Individual mosaicism was quantified as the standard error of the queen-likeness indexes for the six modules. Mosaicism was higher for intercastes than for queens and workers (intercastes/queens: $\text{Chi}^2 = 34.78$, $P < 1.0^{-9}$; intercastes/workers: $\text{Chi}^2 = 13.96$, $P = 0.0002$), and lower for workers than for queens ($\text{Chi}^2 = 19.66$, $P < 1.0^{-6}$) (Fig. 2.4).

Plotting mosaicism against global queen-likeness of each individual showed that mosaicism is continuous between workers and intercastes (Fig. 2.5). Workers with high global queen-likeness, i.e. more “queen-like”, were more mosaic than workers with low

global queen-likeness, and as mosaic as intercastes ($P < 1.0^{-6}$). Inverse non-significant tendencies occurred among intercastes ($P = 0.08$) but not in queens ($P = 0.12$). Inter-individual permutations of queen-likeness indexes erased the general pattern of mosaicism. This showed that the observed mosaicism patterns reflected a biological tendency and were not a methodological artifact.

Shape of variation norms

The six modules did not follow the same variation norms (Fig. 2.6). The abscissa of the inflection point of the fitted logistic functions was different ($P < 1.0^{-6}$) for each module pairwise comparison, except for pronotum vs. propodeum ($t = -2.58$, $P = 0.49$) and for legs vs. gaster ($t = -3.57$, $P = 1$). In addition, the slope at this inflection point was different for each module pairwise comparison ($P < 1.0^{-6}$). As global queen-likeness increased, queen-likeness of pronotum, mesonotum and propodeum started with a long plateau, and then increased suddenly for global queen-likeness values corresponding to intercastes and queens. In contrast, queen-likeness of legs and gaster increased continuously and quickly for workers until it reached a plateau. The two modules with the most divergent pattern were mesonotum and legs. Their relative reaction norms suggest that intercastes resulting from intermediate levels of environmental factor (hence with an intermediate global queen-likeness) should have a worker-like mesonotum and queen-like legs (Fig. 2.7).

Discussion

Although they were rare (1.6 % of adult females), we managed to obtain a reasonable number of intercastes by collecting 60 colonies of *Mystrium rogeri*. Our new morphometric procedure to quantify mosaicism showed that intercastes of *M. rogeri* were more mosaic than workers and queens, and that mosaicism increased continuously from workers to intercastes. We explored the developmental processes generating mosaicism by computing the variation norm (a proxy of reaction norm) of each module. We found that distinct modules exhibited distinct variation norms. Accordingly, intermediate levels of environmental factors induce intercastes with queen-like legs and gaster and worker-like thorax. All intercastes modules fell within the worker-queen variation norm (Fig. 2.6), supporting the hypothesis that intercastes do not result from the disturbed development of some modules, but rather from differences in the variation norms among modules. We

conclude that intercastes are generated by intermediate levels of environmental factors inducing differential responses among modules.

Based on the shape of their variation norms, thoracic modules, especially the mesonotum, have a tighter window of environmental factors sensitivity (i.e. range of global queen-likeness values for which variation norms have the higher slope) on the queen side than other modules. A worker-like thorax morphology is retained for a wide range of individuals that do not need thoracic structure adapted for flight. This is likely to be adaptive in ants since the production of a queen-like flight thorax is very costly (Oster and Wilson 1978). Selective pressures for a cheap thorax may have mainly acted on the mesonotum, which contains wing muscles. Accordingly, the retention of worker morphology is less noticeable for pronotum and propodeum. Conversely, head, legs and gaster show a large window of sensitivity skewed toward workers. The differences of shape of variation norms induce a hierarchical expression of queen-like and worker-like modules. That is environmental factors producing an individual with a queen-like thorax would also already induce queen-like head, legs and gaster. This is in accordance with Okada et al. (2013), who showed that possible patterns of trait combination are limited.

In literature, the production of large quantities of intermediate phenotypes is usually triggered by manipulating the environment or the physiology of the focal organisms (Windig 1994; Murakami et al. 2002). In the case of *M. rogeri*, intercastes spontaneously occur in nature and they may be tested by natural selection. Accordingly, we suggest that intercastes have a high evolutionary significance. We found that most mosaics have queen-like head and gaster but worker-like thorax. These phenotypes are congruent with the morphology of ergatoid queens and soldiers, i.e. the two types of novel castes that are suspected to have evolved by phenotypic recombination (Molet et al. 2012). Indeed, soldiers are individuals recombining a worker thorax (winglessness) with a queen head (defense or seed milling) or a queen gaster (trophic eggs). Similarly, ergatoid queen recombine a worker thorax (winglessness) with queen gaster (reproductive organs). Therefore, ergatoid queens of *M. Oberthueri* (Molet et al. 2007a,b), sister species of *M. rogeri*, could have evolved from intercastes produced in the ancestral species through a process of genetic accommodation (West-Eberhard 2003; Nijhout and Suzuki 2008; Suzuki and Nijhout 2008). Our results thus

support the hypothesis that new castes in ants may have evolved from anomalous queen-worker mosaics.

Intercastes bridge the morphological gap between queens and workers by extending from the distribution of workers and stretching towards queen phenotypes. We found a continuum between workers and intercastes, but a gap between intercastes and queens. This lack of queen-like intercastes could be specific to *M. rogeri* or to our colonies, which were sampled during a short time window. In contrast, Karimi and Molet (unpublished data) found queen-like intercastes in the closely related species *M. mysticum*, and so did Plateau (1970) in *Temnothorax nylanderi*.

Our results contrast with the classical view of a discrete queen/worker caste polyphenism (dimorphism) by revealing a continuous variation norm connecting queens and workers. This is in accordance with studies that show that some polyphenisms actually are reaction norms with statistically underrepresented intermediate morphs in nature (Windig 1994; Nijhout 2003). Discrete variation can either be caused by a discontinuous environment, or by a non-linear developmental response to a continuous environment. The second case involves a sigmoid reaction norm that reduces the environmental window inducing intermediate phenotypes (Nijhout 2003). Our procedure did not enable us to conclude whether nurse workers generate discrete breeding conditions or whether the discrete variation is due to a very small window of sensitivity. Indeed, we do not know if the global queen-likeness that we used to establish variation norms is linearly correlated to environmental factors or not.

Ergatoid queens and soldiers evolved numerous times in ants (Hölldobler 1990; Peeters 1991b; Molet et al. 2012), and they display a tremendous morphological diversity. Yet, a caste of flying sterile workers, as found in bees and wasp, has never been found in ants. Presumably, the lack of strong selective pressures on ant colonies or the poor flight skills of ant queens have prevented the evolution of such costly phenotypes. Nevertheless, we have shown that irrespective of these reasons, the differential reaction norms between modules in ants cannot generate such phenotypes hence they cannot evolve by phenotypic recombination. Developmental processes thus both enhance and restrain the potential of ants to produce new phenotypes and evolve novel castes.

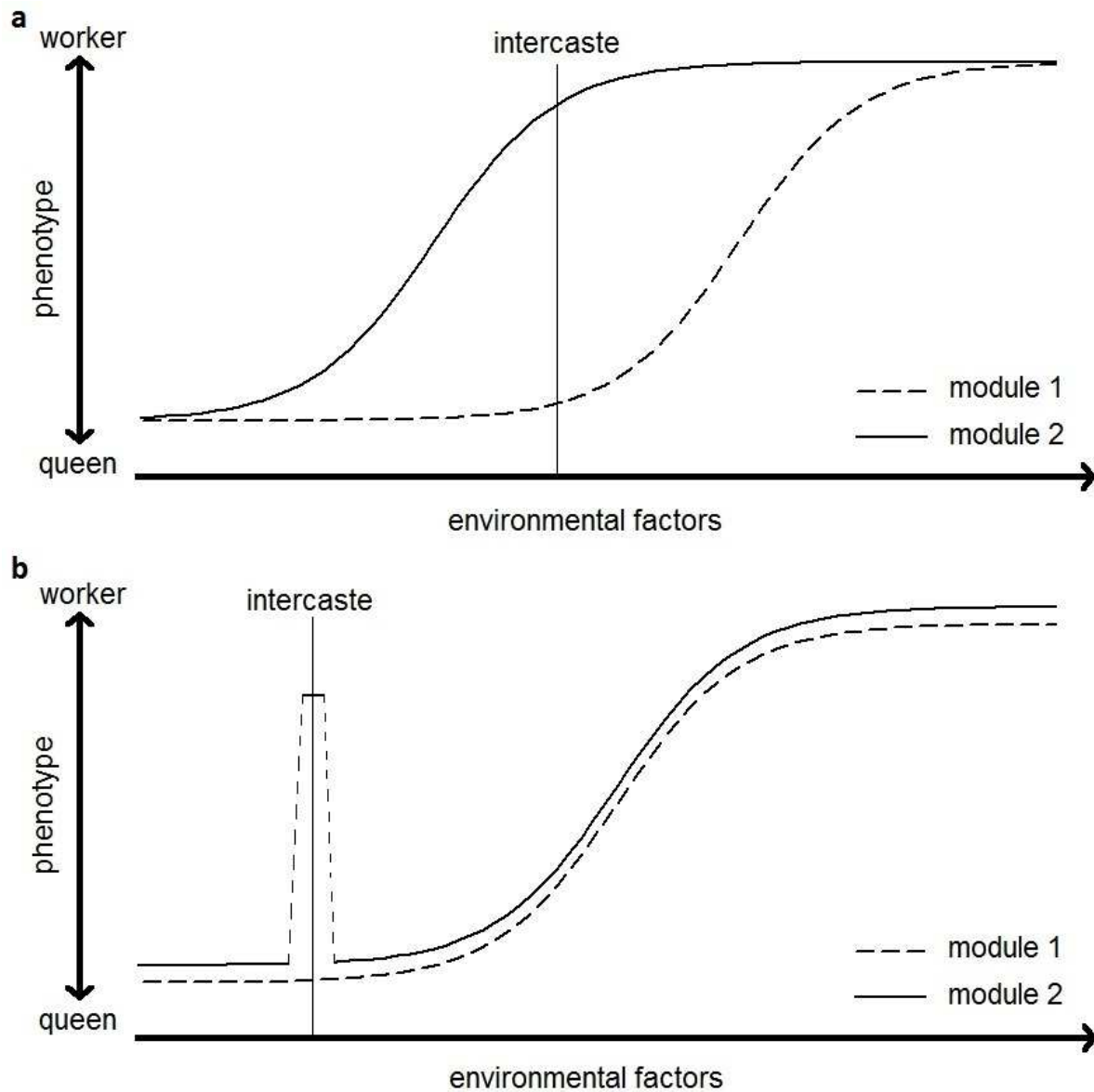


Figure 2.1: Alternative hypotheses for the origin of intercaste production. This theoretical case only shows two morphological modules that can be either queen-like or worker-like depending on the environmental factors experienced by the larvae. Environmental factors include food, temperature, pheromones, and interactions with workers. Queen and worker phenotypes result from extreme levels of environmental factors to the right or the left of the figure. Intercaste production may result from: a) an intermediate level of environmental factors with different shapes of reaction norms among modules; b) an alteration of the threshold response in a particular individual in module 1 but not in module 2.

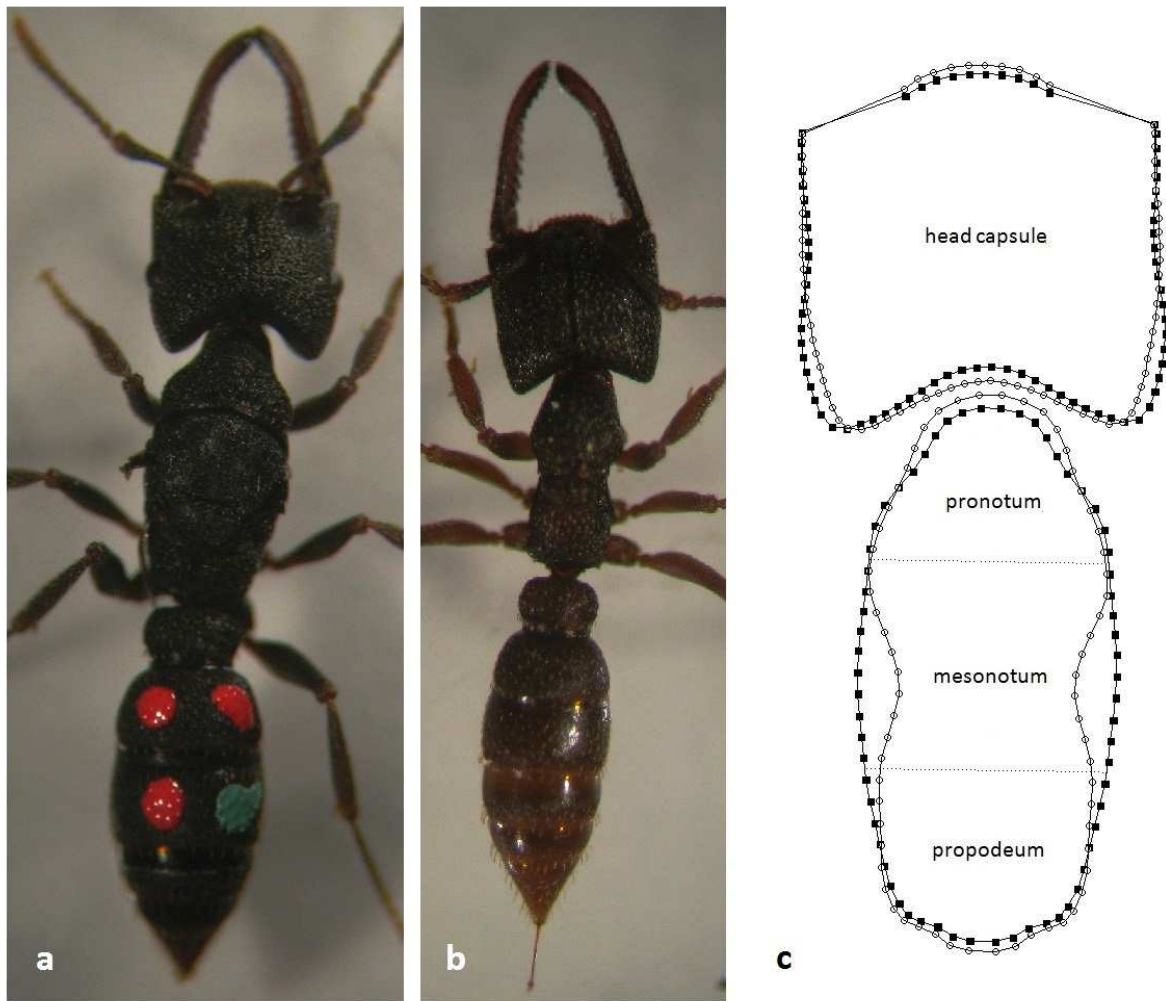


Figure 2.2: Morphological differences between queen (a, black squares in c) and worker (b, empty circles in c) castes for head capsule, pronotum, mesonotum and propodeum. The graph c shows the outlines and the positions of semi-landmarks after the sliding. Difference of morphology between both castes is amplified by 10 % for head.

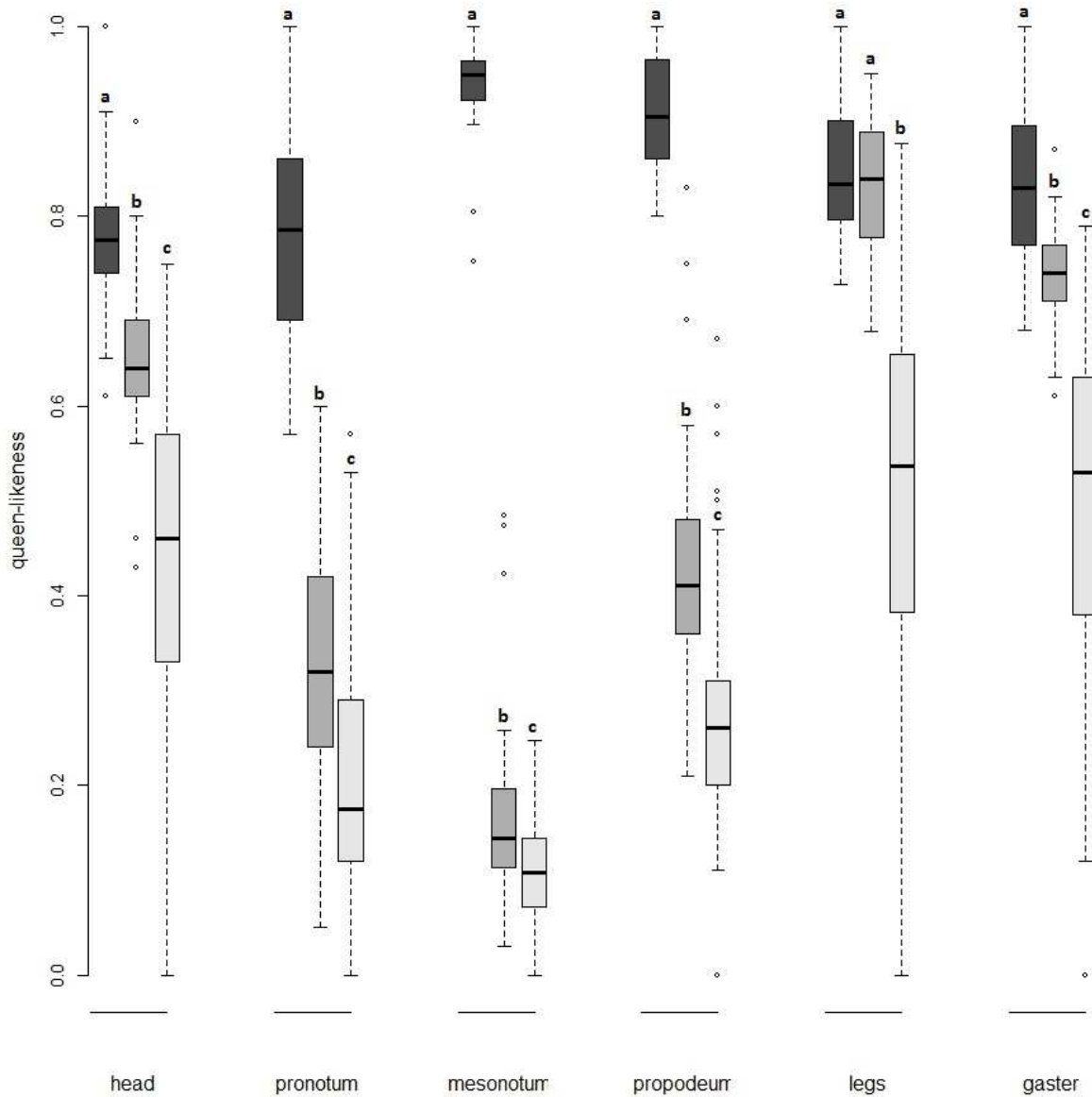


Figure 2.3: Comparison of queen-likeness indexes for each module between groups (dark grey: queens; medium grey: intercastes; light grey: workers). Boxes represent median, quartiles and extreme values. Letters indicate differences of distribution within each module. Intercastes queen-likeness was different from and intermediate between queens and workers except for legs that did not differ from queens.

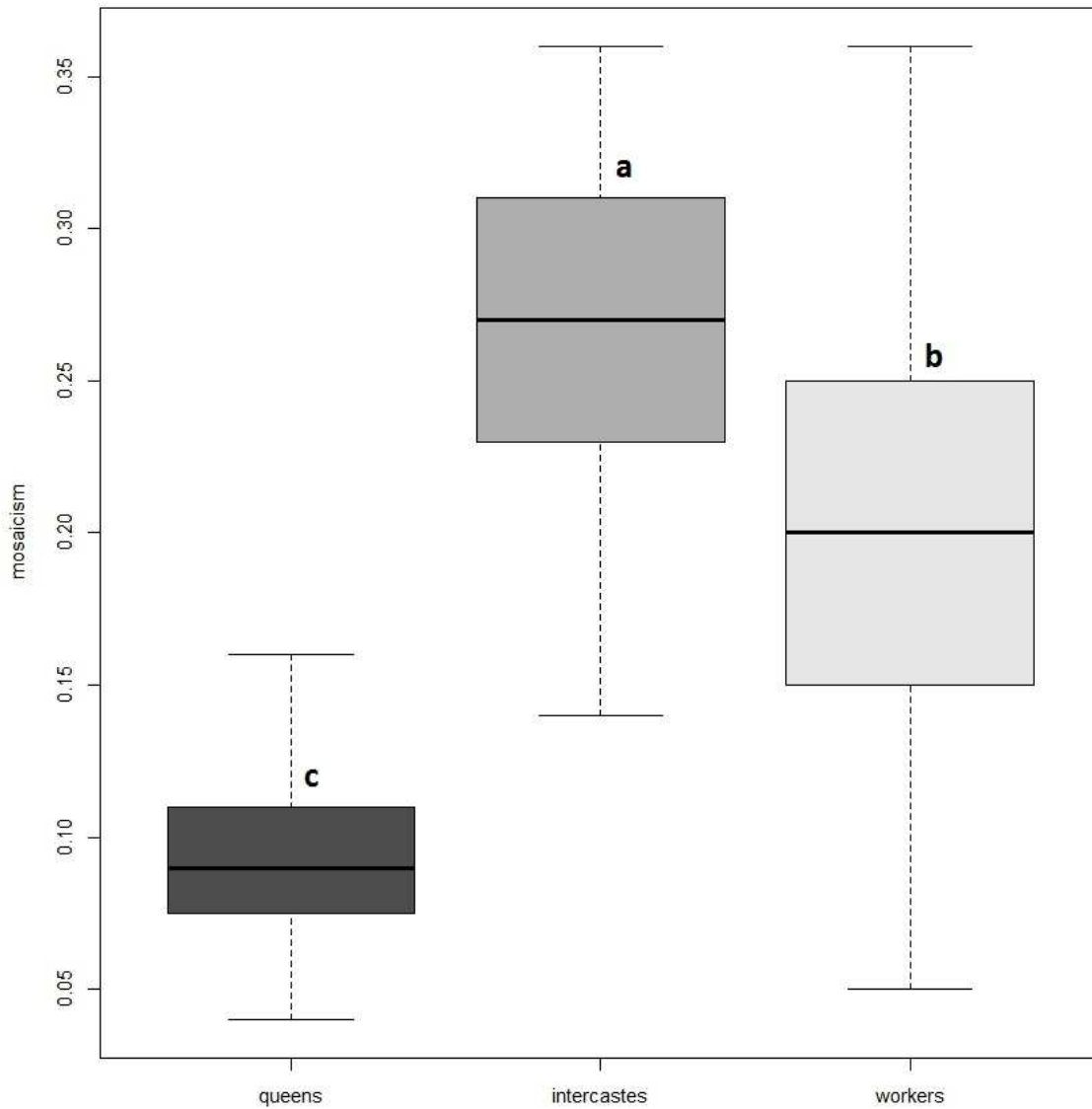


Figure 2.4: Comparison of the level of mosaicism distribution between groups (dark grey: queens; medium gray: intercastes; light grey: workers). Boxes represent median, quartiles and extreme values. Letters indicate differences of distribution of mosaicism among queens, workers and intercastes. Workers are more mosaic than queens, and intercastes are more mosaic than queens and workers.

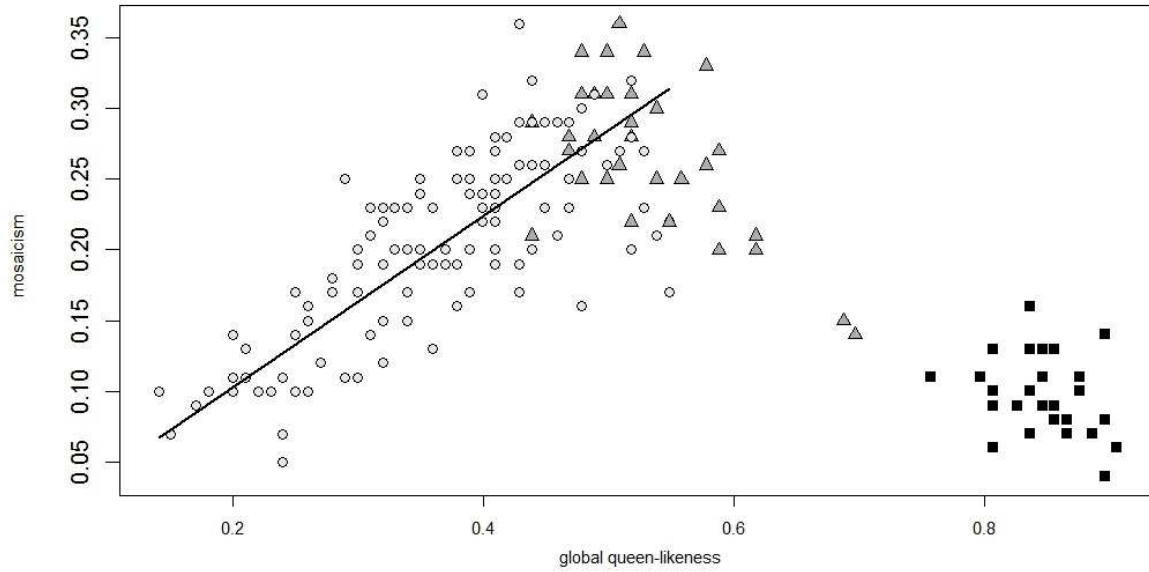


Figure 2.5: Mosaicism as a function of global queen-likeness for each individual (black squares: queens; grey triangles: intercastes; empty circles: workers). As global queen-likeness increase, mosaicism increase from workers to intercastes. Mosaicism tends to decrease with global queen-likeness for intercastes. They is no quantitative difference between the more queen-like workers and intercastes. Inter-individual permutations of queen-likeness indexes erased the general pattern of mosaicism indicating that it is not a methodological artifact.

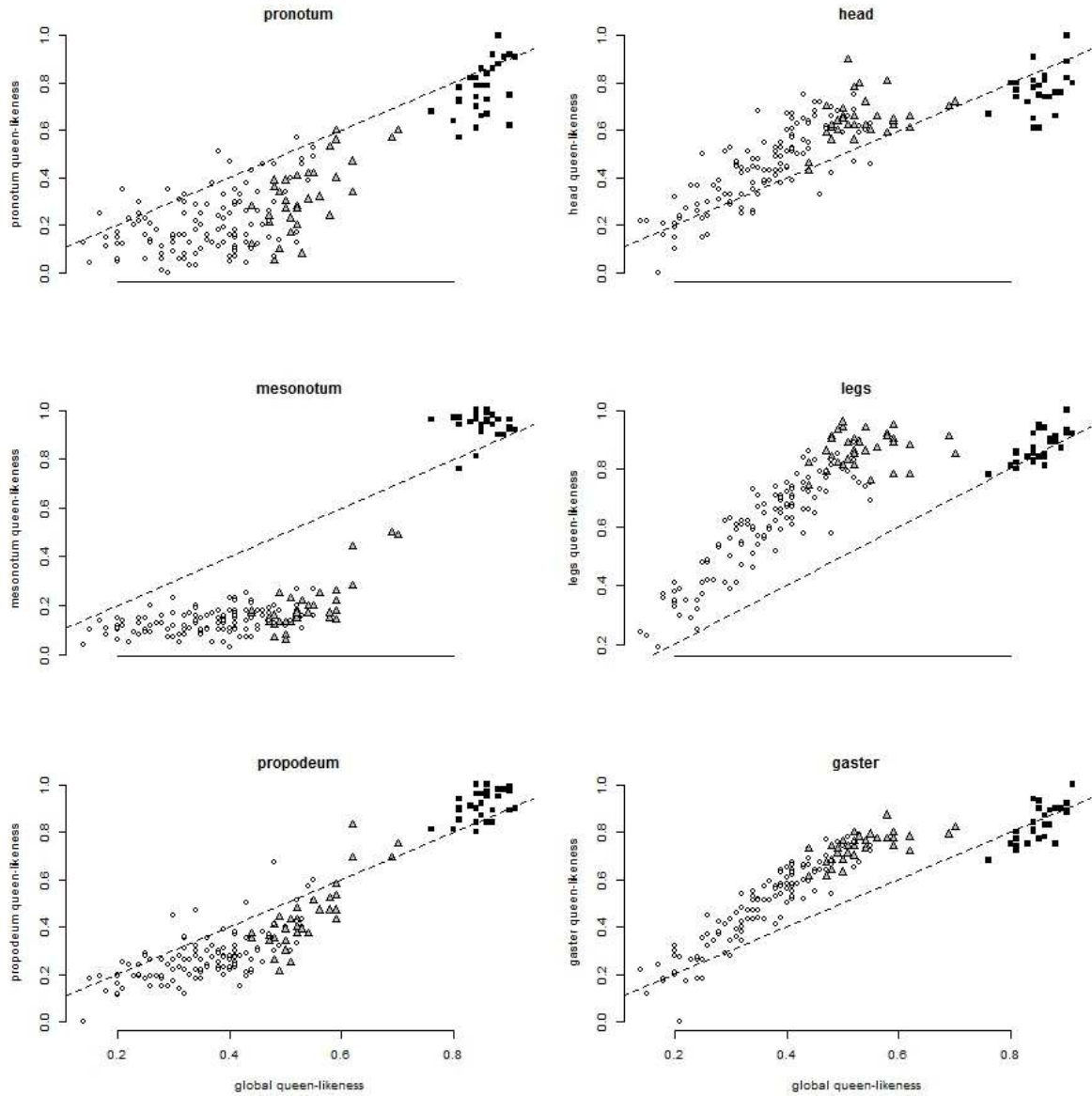


Figure 2.6: Variation norms for the six modules. Black squares: queens; grey triangles: intercastes; empty circles: workers. Dashed lines: isomorphic line for which queen-likeness of the focal module (ordinate) is similar to global queen-likeness. Two types of modules could thus be identified. The queen-likeness of the three thoracic modules was lower than the global queen-likeness; and the queen-likeness of non-thoracic modules (head, legs and gaster) was higher than global queen-likeness.

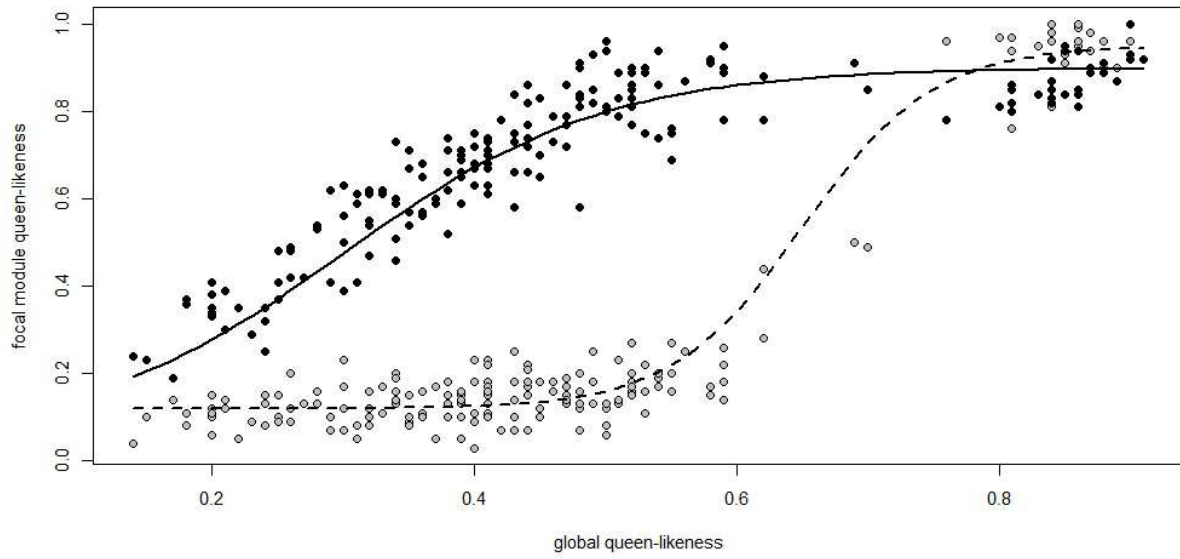


Figure 2.7: Variation norms for mesonotum (gray circles and dashed line) and legs (black circles and solid line). Relative patterns for these two modules suggest that intercastes resulting from intermediate levels of environmental factors (having a intermediate global queen-likeness) should present a low queen-likeness for mesonotum and a high queen-likeness for legs. Conversely it is not possible to produce individual with a high queen-likeness for thorax without a high queen-likeness for legs.

Tables

Table 2.1: Number of queens, intercastes and workers from each colony in our sampling

| colony | queens | intercastes | workers |
|--------|--------|-------------|---------|
| #637 | 1 | 9 | 21 |
| #654 | 13 | 5 | 47 |
| #652 | 1 | 2 | 2 |
| #635 | 5 | 7 | 9 |
| #551 | 0 | 1 | 1 |
| #649 | 4 | 1 | 4 |
| #574 | 0 | 3 | 3 |
| #553 | 1 | 1 | 1 |
| #558 | 0 | 1 | 1 |
| #543 | 1 | 0* | 1 |
| #XXX | 0 | 1 | 1 |
| #647 | 2 | 5 | 32 |
| #557 | 1 | 1 | 1 |
| total | 29 | 37 | 124 |

Note: * Initially there was an intercaste in the colony #543 but it has been damaged during handling and was unusable.

Acknowledgments

This work was funded by a grant from Agence Nationale de la Recherche to MM and TM (project AntEvo ANR-12-JSV7-0003-01).

III- VARIABILITE COMPORTEMENTALE DES INTERCASTES

*Environmentally induced anomalous
phenotypes promoting evolvability in ants*

Cette partie correspond à un article en préparation, coécrit par les auteurs suivants :

Sylvain Londe¹, Thibaud Monnin¹, Brian L. Fisher² and Mathieu Molet¹

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR CNRS 7618 Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris, France

2 Department of Entomology, California Academy of Sciences, Golden Gate Park, 55 Music Concourse Drive, San Francisco, California 94118, USA

Keywords: caste, intercaste, polyphenism, plasticity, polyethism, developmental recombination.

Introduction

The evolution of eusocial insects involved an enhancement of the differences between reproductive queens and non-reproductive workers (Wilson 1971; Wheeler 1986). Furthermore, in numerous ant lineages, division of labor led to the evolution of variable degrees of worker polymorphism (Hölldobler and Wilson 1990). This resulted in the evolution of two or more distinct morphological and behavioral castes (Wilson 1971; Michener 1974; Heinze and Tsuji 1995). Thus in many ant species there is a caste of wingless sterile workers and a caste of winged queens that found new colonies alone and disperse by flight (i.e. reproductive strategy called independent colony foundation). In other species, winged queens have been replaced by a caste of wingless queens, called “ergatoïde queens”, and new colonies are founded by fission of the old colony (i.e. alternative reproductive strategy called dependent colony foundation) (e.g. Peeters and Molet 2010; Cronin et al. 2013). Many species have independently evolved a caste of soldiers that specialized in particular tasks such as colony defense (Oster and Wilson 1978), production of trophic eggs (Wilson 1974; Heinze et al. 1995) or blocking of nest entrance (Powell 2008).

In most ant species, morphological castes are not determined genetically (Huxley 1932; Wheeler 1986) but are generated by phenotypic plasticity. Phenotypic plasticity is the ability of a single genotype to produce variable phenotypes in response to variable environmental factors (Debat and David 2001; Whitman and Agrawal 2009). Although this concept has initially been used for morphological traits (Woltereck 1909; Schlichting and Pigliucci 1998), all phenotypic characters, including physiology, behavior and other life history traits, can be studied under the conceptual framework of plasticity (West-Eberhard 2003; Westneat and Fox 2010).

Ant polyphenism and the associated polyethism are adaptive and account for their ecological success (Wilson 1987, 1990). In addition, they are suspected to play a role in the diversification of ants by facilitating the evolution of new castes. Indeed, Molet et al. (2012) proposed that some new castes could have evolved by combining traits that are normally expressed in individuals with alternative phenotypes into a single individual via a process of developmental recombination. Developmental combination is a mode of combinatorial evolution suggested by West-Eberhard (2003) and susceptible to be an important factor of

phenotypic novelty (West-Eberhard 2005a, see also b). Indeed, environmental, genetic or developmental perturbations may cause the expression of phenotypic plasticity and induce the production of anomalous phenotypes that constitute a range of variants on which selection can secondarily act. If some of these variants are associated with new functions, their production may be selected for at the colony level and fixed as a novel caste through genetic accommodation (West-Eberhard 2003, 2005b; Nijhout and Suzuki 2008; Suzuki and Nijhout 2008).

Anomalous individuals recombining traits from different castes are called intercastes and have been described in about 20 species (Plateaux 1970; Peeters 1991; Molet et al. 2012; Okada et al. 2013; Londe et al. submitted). They are highly variable mosaic phenotypes produced spontaneously in natural conditions at relatively low frequencies. In species with winged queens, intercastes are wingless but may present flight sclerites and some wing stubs. In addition, their number of ocelli and ovarioles and their body size vary continuously between those typical of queens and those typical of workers (Peeters 1991b). Because they stand out of the normal morphology of worker and queen phenotypes, intercastes may result from a non-adaptive plasticity (see Emerson 1984). Unlike adaptive plasticity that originates from past selection during a population's history, non-adaptive plasticity may result from sensitivity to external factors (e.g. parasites, pathogens, environmental stresses, poor nutrition, extreme temperatures) that have not been incorporated by evolution into the developmental program (Schmalhausen 1949; Stearns 1989; Whitman and Agrawal 2009). Non-adaptive plasticity thus produces phenotypic variants without a proper regulation of developmental processes (Van Kleunen and Fischer 2005).

The theory of evolution of novel castes by developmental recombination predicts that some variants initially produced by non-adaptive plasticity, that is some of the intercastes, will eventually be incorporated in the developmental program of the organism (Molet et al. 2012). The plausibility of such a process depends on the colony level fitness costs and benefits of intercastes. If costly, selection should favor genes that specifically reduce the sensibility of development to environmental stimuli that trigger anomalies. If advantageous, selection should act on genes involved in development to alter the reaction norm, i.e. fix the morphology of the new caste, and associate this new phenotype with a larger range of environmental stimuli (Whitman and Agrawal 2009). Accordingly it is

important to evaluate the costs and benefits of intercastes. However, although intercaste morphologies have received some attention (Plateaux 1970; Peeters 1991; Okada et al. 2013; Londe et al. submitted), almost nothing is known of their behavior within colonies.

We present here the first quantitative assessment of intercaste behavior, using the amblyoponine ant *Mystrium rogeri*. We analyzed the behavior, including location in the nest and task performed by individuals in order to determine whether intercastes are behaviorally functional. We compared their ethological profile with those of queens and workers and we investigated whether they exhibit new behavioral profiles susceptible to be selected for under particular selective pressures.

Material and Methods

Biological material

60 colonies of *Mystrium rogeri* were collected in a rainforest (21°51'08''E, 47°40'99''S \pm 200 m, altitude 1063 m) in Andrambovato, Madagascar, in November 2011 and January 2013. We identified intercastes based on discrete characters. Queens (as well as gynes, i.e. virgin queens) have three ocelli and a winged and segmented oval shaped thorax whereas workers have no ocelli and a wingless and fused hourglass shaped thorax. Consequently, individuals were classified as intercastes if (1) they had one ocellus, two ocelli, or three ocelli but of reduced size or (2) they were wingless but had wing stubs or relatively unfused flight sclerites. Colony contained 6.1 ± 4.2 queens (mean \pm sd), 40.4 ± 20.5 workers and 15 ± 10.4 males. Only 19 colonies (31 %) had intercastes. In these colonies intercastes number was $2.4 (\pm 1.2)$. We used the four colonies (#574, #637, #647 and #654) with the highest number of intercastes (respectively 6, 9, 10 and 7). Colony #574 was queenright and had no gyne, while colonies #637, #647 and #654 were queenless and contained several gynes. Our sample thus consisted of 272 workers, one queen, 12 gynes, and 32 intercastes from four colonies (Table 1). In the laboratory, each colony was housed in a nest consisting of a 10cm diameter petri dish with a transparent lid allowing for behavioral observations and a plaster floor. This dish was placed in a 30 by 30 cm box with a plaster floor serving as foraging area and maintained humid at 25°C. Colonies were fed mealworms (*Tenebrio molitor*, Tenebrionidae) every other day.

Behavioral data

Each individual was marked with a unique color code consisting of four paint dots on the abdomen. Behavioral surveys were performed using the scan sampling method (Lehner 1998). Several scans were carried out daily over a period of 30 days, totalizing 40 scans for each colony. Each scan lasted between 30 and 50 min because of the difficulty to find each individual among its nestmates. This is much longer than the recommended duration as this method should ideally be almost instantaneous. Consequently, we randomized the order following which individuals were scanned between successive samplings to avoid any potential bias resulting from systematically observing some individuals before others. Both individual location and task performed were recorded at each scan and then analyzed as two distinct component of behavior. We considered five locations and seven tasks (Table 2). We estimated the proportion of time spent by each individual at each location and performing each task. Agonistic interactions occurring during the scan sampling were also recorded in order to establish the rank of individuals in a dominance hierarchy. Six types of agonistic interactions were considered (table 2).

Multivariate analyses of location and task

Firstly, we performed a Correspondence Analysis on location and task data, which provides a descriptive view of the distributions of individuals in the location and task space with no *a priori* hypothesis about their morphological caste. Secondly, in order to determine whether some intercastes present novel profiles of location or task, we quantified their isolation in the multivariate space for location and for task. For this purpose, we computed the density of points (individuals) in the neighboring space of each focal individual, and then compared this density for gynes, workers and intercastes. Finally, we performed a Between Group Analysis (BGA) (Culhane et al. 2002) in order to visualize multivariate data in a 2D plan that maximizes the variance between gynes and worker groups. Intercastes were then projected onto this plan. BGA was conducted using all variables together including not only location and task data, but also location and task specialization and dominance scores (see below for calculation of these variables).

Specialization calculation

Individual behavioral specialization being a key feature in division of labor (Wilson 1971; Oster and Wilson 1978), we measured the tendency for individuals to be always at the same location or to repeat the same task using Shannon & Wiener's information variable "H" (Lehner 1998; Shannon 2001):

$$H = - \sum p(x) \ln p(x)$$

Where $p(x)$ is the proportion of scans for which the focal individual was performing task x or was in location x . "H" theoretically varies from "0" for individuals found at all locations with the same frequency or spending equivalent time in each task, to "1" for individuals always found at the same location or always performing the same task. Significance of specialization level of each individual was tested against the distribution of specialization levels expected by chance, computed on location and task data randomized among individuals.

Dominance scores

Each type of agonistic interactions was associated with a specific coefficient of aggressiveness based on its violence (Table 2): antennal boxing (ab, coef 1), mandibles bite (mb, coef 2), coxal hit (ch, coef 3), causing escape (cs, coef 4), mandibles snap (ms, coef 4) and sting attempt (sa, coef 5). Individual ranks in the hierarchy were obtained using the "Inconsistencies & Strength of Inconsistencies" (I&SI) method of linear ordering proposed by De Vries (1998). This procedure consists in an iterative algorithm allowing minimization of inconsistencies (i.e. the number of agonistic interactions from a lower-ranked toward a higher-ranked individual) and their strength (i.e. rank differences between individuals involved in inconsistencies). Each individual was attributed a dominance score ranging from 0 for the most subordinate individuals to 1 for the most dominant one. No score was attributed to individuals that were not involved in agonistic interactions. Among individuals implicated in at least one agonistic interaction, we distinguished "concurrents" that both won and lost some contests, and "subordinates" individuals that lost all their contests.

Gyne, worker and intercaste comparisons

We compared specialization and dominance scores between gynes, workers and intercastes using non-parametric Kruskal-Wallis tests. In order to maximize statistical power, we pooled specialization data from the four colonies. We overcome the colony effect by working on the residuals of a linear model taking into account this effect. Dominance scores were computed for each colony separately and then pooled together.

Results

Behavioral profiles

The Correspondence Analysis for location (Fig. 3.1a) showed that most individuals were located along a horseshoe shaped trajectory ranging from a location close to the brood to a location outside the nest, with no clear discrimination between groups. The queen was located in the brood whereas 11 out of 12 gynes were located away from the brood. Workers and intercastes were indistinctly distributed over the whole horseshoes shaped trajectory, from the brood to outside of the nest. The spatial density of the multivariate space revealed that intercastes were spatially more isolated than workers ($\text{Chi}^2 = 4.13$, $P = 0.04$) (Fig. 3.2a). This is because five of the 32 intercastes were relatively isolated from other individuals, in the central region of the multivariate space (Fig. 3.1a, intercastes noted #75, #76, #176, and to a lesser degree #74 and #111). No differences in the degree of isolation were detected between gynes and workers ($\text{Chi}^2 = 0.0004$, $P = 0.98$) and between gynes and intercastes ($\text{Chi}^2 = 1.505$, $P = 0.23$) (Fig. 3.2a).

The Correspondence Analysis for behaviors was not very informative, with four out of the seven behaviors clumped together. Total variation was mainly due to inter-individual differences in “brood care”, “self-directed behaviors” and “foraging” (Fig. 3.1b). However, the distributions of castes were completely overlapping, so no caste effect could be seen. One intercaste (#176) was extremely specialized in brood care. The spatial density of the multivariate space for behaviors showed that there were no differences in isolation between gynes, workers and intercastes (gynes/workers: $\text{Chi}^2 = 0.615$, $P = 0.43$; gynes/intercastes: $\text{Chi}^2 = 0.087$, $P = 0.77$; workers/intercastes: $\text{Chi}^2 = 0.87$, $P = 0.35$) (Fig. 3.2b).

BGA showed a weak discrimination between gynes and workers (Fig. 3.3). Gynes were confined in the corner of low PC1 and PC2 values but completely overlapped worker distribution. Intercastes had the same distribution as workers. PC1 (contribution) was mainly reflecting the variable “dominance scores”.

Behavioral specialization

63% of individuals presented a significant spatial specialization. Intercastes had a lower spatial specialization than workers ($\text{Chi}^2 = 8.892$, $P = 0.002$) (Fig. 3.4a). There was no differences in spatial specialization between gynes and workers ($\text{Chi}^2 = 0.120$, $P = 0.73$) and between gynes and intercastes ($\text{Chi}^2 = 2.101$, $P = 0.15$). 79% of individuals showed a significant task specialization. Levels of task specialization differed only between gynes and workers, gynes being less specialized than workers (gynes/workers: $\text{Chi}^2 = 4.221$, $P = 0.04$; workers/intercastes: $\text{Chi}^2 = 1.304$, $P = 0.25$; gynes/intercastes: $\text{Chi}^2 = 1.502$, $P = 0.22$) (Fig. 3.4b).

Dominance hierarchy

193 individuals (61%) were never involved in agonistic interactions and had no score. Among individuals involved in at least one agonistic interaction, 78 individuals (24.6%) won at least one contest whereas 46 individuals (14.5%) lost all contests (subordinates). In the dominance hierarchy, gynes ranked significantly lower than workers and intercastes (gynes/workers: $\text{Chi}^2 = 10.261$, $P = 0.001$; gynes/intercastes: $\text{Chi}^2 = 6.288$, $P = 0.01$), but there was no difference between workers and intercastes ($\text{Chi}^2 = 0.378$, $P = 0.54$) (Fig. 3.5).

The proportion of subordinate gynes was more than fourfold that of subordinates workers and subordinate intercastes, while the proportion of concurrent intercastes was more than twice that of concurrent gynes and concurrent workers (Fig. 3.6).

Discussion

Our analysis of 40 successive locations and tasks performed revealed no clear differences between gynes, workers, and intercastes from four colonies of *Mystrium rogeri*. Because intercaste morphologies are intermediate between gyne and worker morphologies (Londe et al. submitted), one logical expectation was that their behavioral repertoires would

also be intermediate. However, such a clear pattern could not occur in *M. rogeri* given that the distributions of gynes and workers widely overlapped for both Correspondence Analyses and Between Class Analysis. Nevertheless, we found that gynes were remarkable in three points: they were located relatively far away from the brood, they were always subordinate individuals, and they showed a lower task specialization than workers. It is noticeable that intercastes differed from gynes and were similar to workers in these three points. That is, intercastes had behavioral profiles more similar to workers than to gynes.

This ethological survey revealed no “aberrant” intercaste behavior susceptible to make them dysfunctional individuals. Indeed, our results show that intercastes are active individuals contributing to collective tasks together with other nestmates, and the overlap of worker and intercaste distributions show that they have similar behavioral profiles hence intercastes are likely equally efficient as workers. Nevertheless, intercastes are proportionally involved in more agonistic interactions than workers. This likely entails some energetic costs (Gobin et al. 2003), reduce brood care by intercastes due to the tradeoff with aggressive activity, and also reduce brood care by subordinate workers due to their frequent interruptions by aggressive intercastes (Cole 1986; Monnin and Ratnieks 1999). Therefore, an important intercaste production may result in high aggression rates and thus be detrimental at the colonial level.

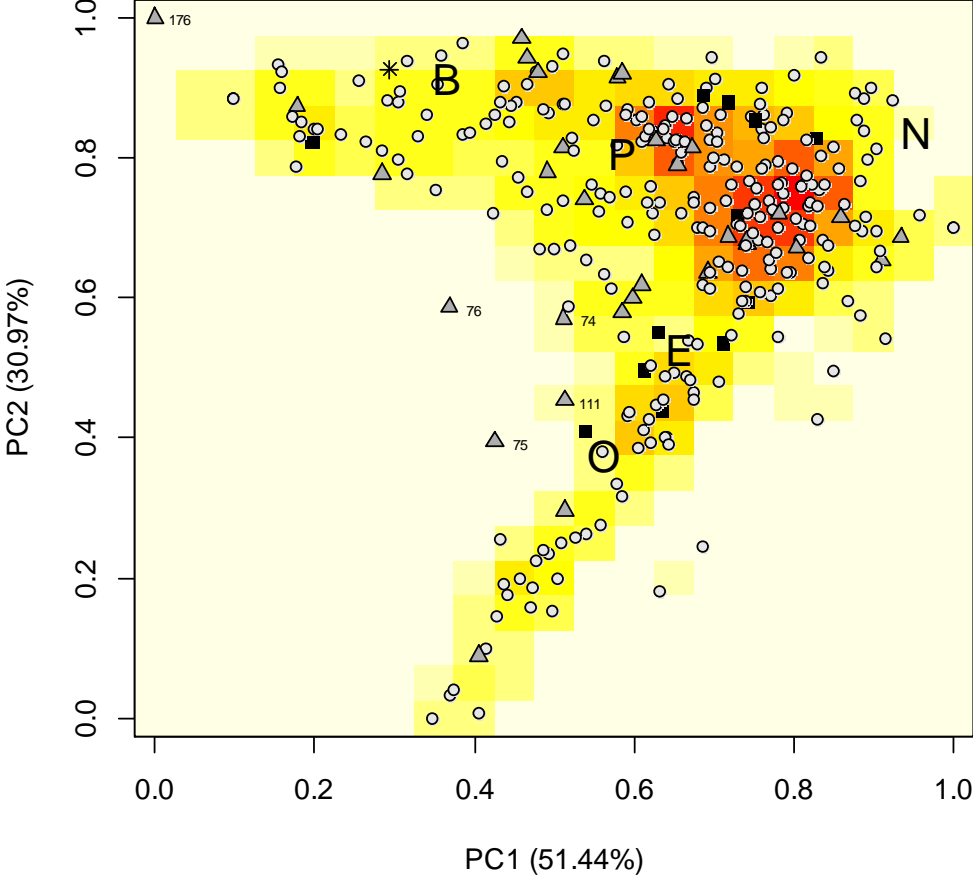
Social conflicts and dominance hierarchies result from individuals propensities to reproduce themselves rather than act as helper (e.g. Heinze et al. 1994). For instance, in permanently queenless ants mating and egg laying are typically restricted to dominant individuals (e.g. Monnin and Peeters 1999; Cuvillier-Hot et al. 2002), and in species with queens male production by workers is often prevented by physical aggression of workers with developed ovaries (e.g. Ratnieks 1998, Gobin et al. 1999). Therefore, the relatively high implication of intercastes in agonistic interactions suggest that they are hopeful reproductives competing for dominant status as occurs in others species (e.g. Monnin and Ratnieks 1999; Molet et al. 2005). Gynes were also highly involved in agonistic interactions but unlike intercastes they were almost always subordinate. This may not reflect the behavior of gynes in natural nests because in nature, gynes rapidly leave the colony to mate and found new colonies (Hölldobler and Wilson 1990). In contrast, our gynes had been in the nest for a longer time. They consequently returned in the nest and removed their wings.

The evolution of novel castes by phenotypic recombination implies that new inductive factors or changes in the reaction norms trigger the production of phenotypic variants of which some could be associated with new functions. Our study showed that intercastes were more isolated in the multivariate space for location, indicating that some of them exhibit a location pattern that differs from queens, gynes and workers. We also found that they presented a lower spatial specialization than workers, meaning that they are more mobile. Although these effects result from only five intercastes, this suggests that production of intercastes allow for the exploration of new mobility profiles. However intercastes did not perform new patterns of tasks relative to queens, gynes and workers. This may be an artifact caused by the noisy nature of task data, some behaviors being more or less difficult to tell apart. We found that intercastes are variables behavioral phenotypes presenting no obvious deleterious behavior at the individual level, and that some of them could be hopeful reproductive. The selective pressures against reproductive conflicts probably limit intercaste production but do not completely suppress it. Thus, intercastes with a wingless thorax but a high reproductive potential are likely to be produced recurrently in *Mystrium rogeri*. Such a phenotype is strongly similar to ergatoid queens, i.e. wingless queens that are adapted for dependent colony foundation (Heinze and Tsuji 1995; Heinze and Keller 2000; Peeters and Ito 2001; Peeters and Molet 2010; Cronin et al. 2013). Consequently, any environmental change making dependent colony foundation more efficient than independent colony foundation could initiate a process of genetic accommodation. The reaction norms would be adjusted in such a way that the production of the adapted intercastes would increase until a regular novel phenotype is fixed, i.e. a novel ergatoid queen caste has evolved.

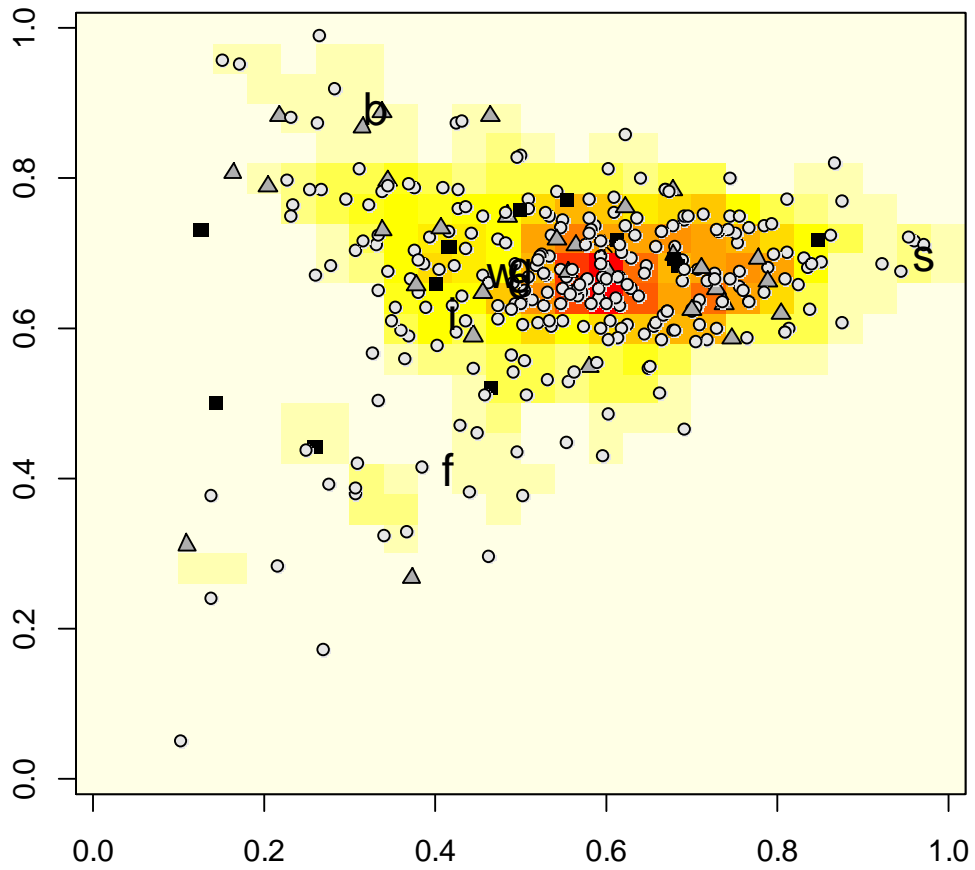
Our behavioral results support the theory that novel caste evolution is more likely to occur by developmental recombination, i.e. the production of environmentally-induced variants (intercastes) and their subsequent fixation, than by mutational variants. Two main reasons support this evolutionary mechanism: (i) because intercastes are environmentally induced, they are produced at high frequency relative to mutational variants and consequently they are less susceptible to loss by stochastic effects; (ii) they are more likely to be functional and exhibit advantageous behavioral profiles than random mutational

variant because, as shown in this study, their behavior is canalized along a helper-reproductive axis derived from the queen-worker adaptive polyphenism.

Figures



a)



b)

Figure 3.1: Correspondence Analysis for locations (a) and tasks (b) of gynes (black squares), queen (black star), workers (empty circles) and intercastes (grey triangles) projected on the density of individuals in the multivariate spaces (color gradient yellow for low density to red for high density). Locations: on the brood (B), in brood periphery (P), in the nest far from the brood (N), near the nest entrance (E), and outside the nest (O). Tasks: brood care (b), nest cleaning (c), giving or receiving grooming (g), walking in the nest (w), foraging (that is walking outside the nest) (f), self-directed behaviors (s) and inactivity (i).

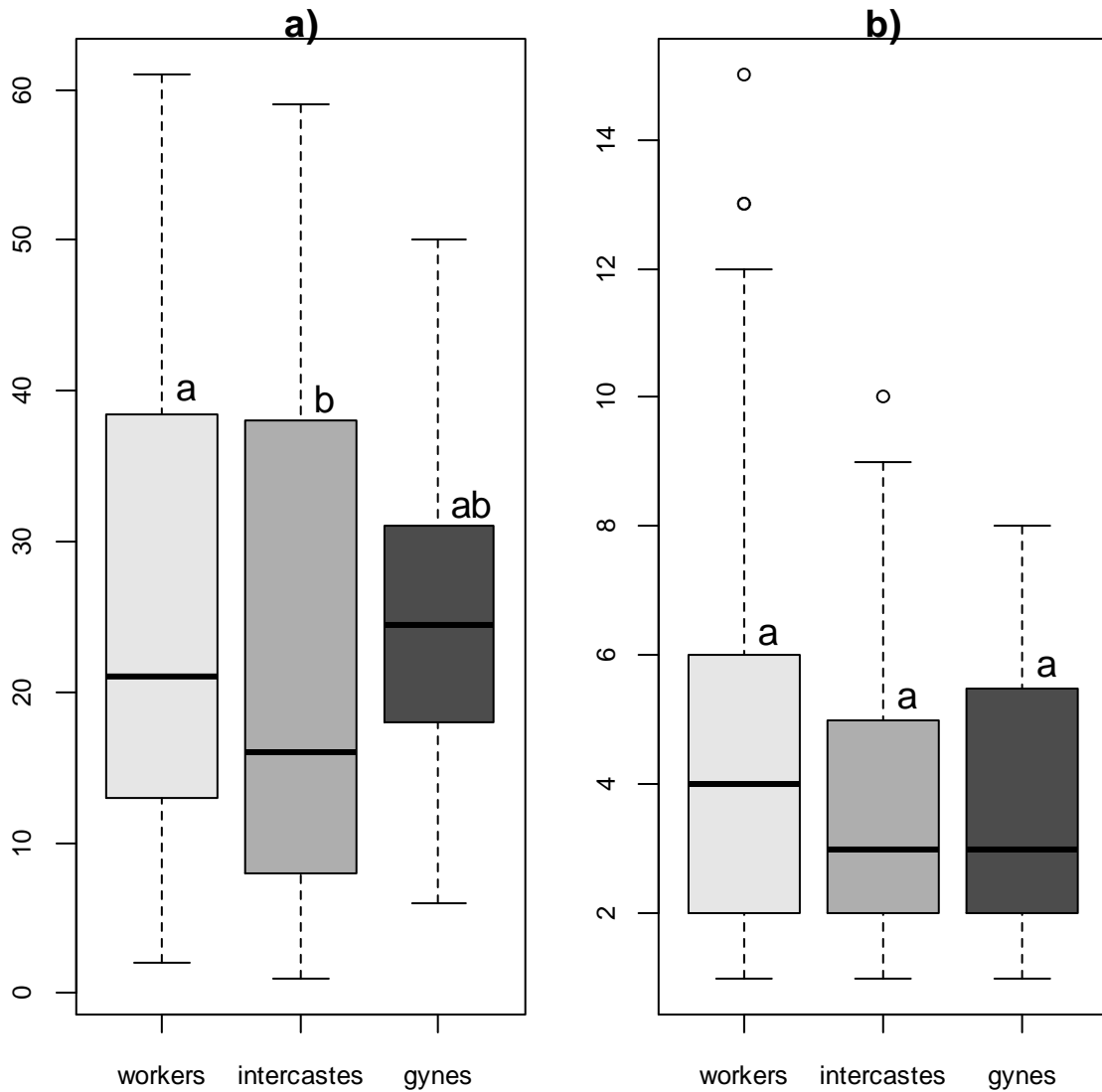


Figure 3.2: Density of individuals around gynes (dark grey), intercastes (middle grey) and workers (light grey) in the multivariate spaces of locations (a) and tasks (b). a: Regarding locations, intercastes occupied a regions with lower densities of individuals than workers, i.e. they were more isolated than workers. No differences were found between workers and gynes and between gynes and intercastes. b: Regarding tasks, no differences were found between gynes, workers and intercastes in terms of the densities of individuals around them. Boxes represent median, quartiles and extreme values. Letters indicate significant differences between groups.

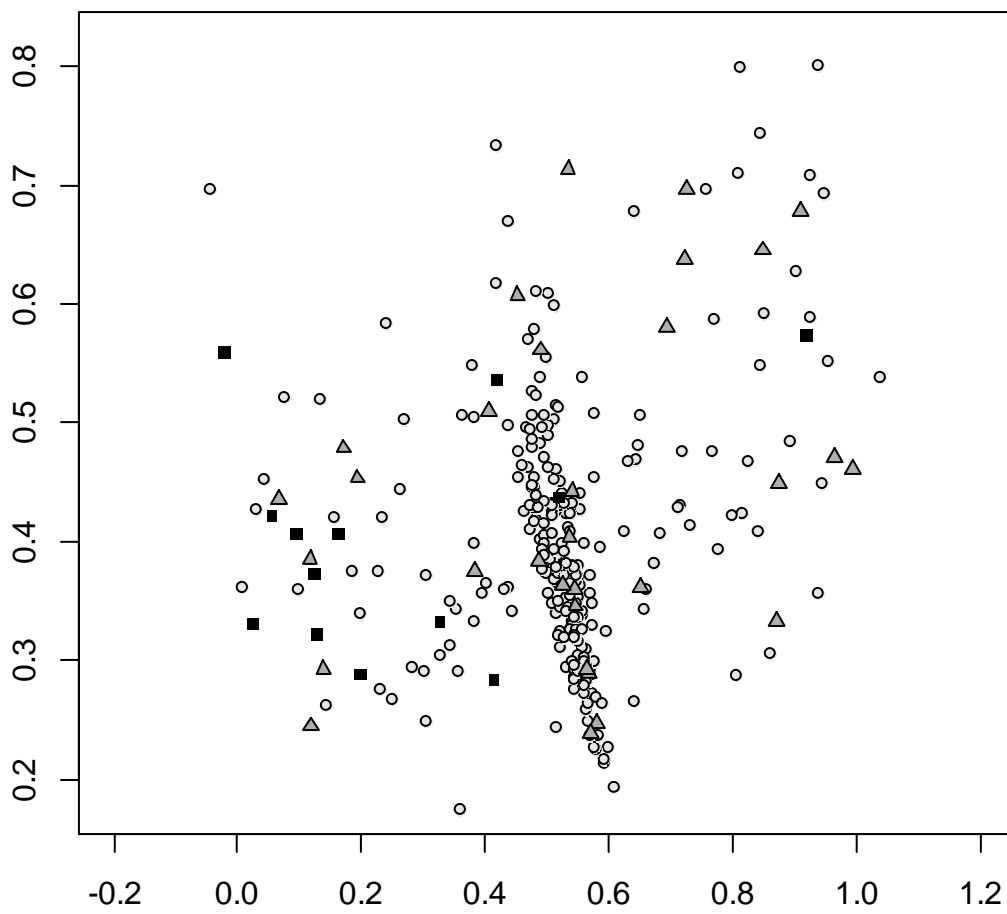


Figure 3.3: Between Class Analysis (BGA) pooling all variables (location and task profiles, spatial and task specialization and dominance scores). Intercastes (grey triangles) being projected secondarily, the 2D plan maximizes the variance between gynes (black squares) and workers (empty circles).

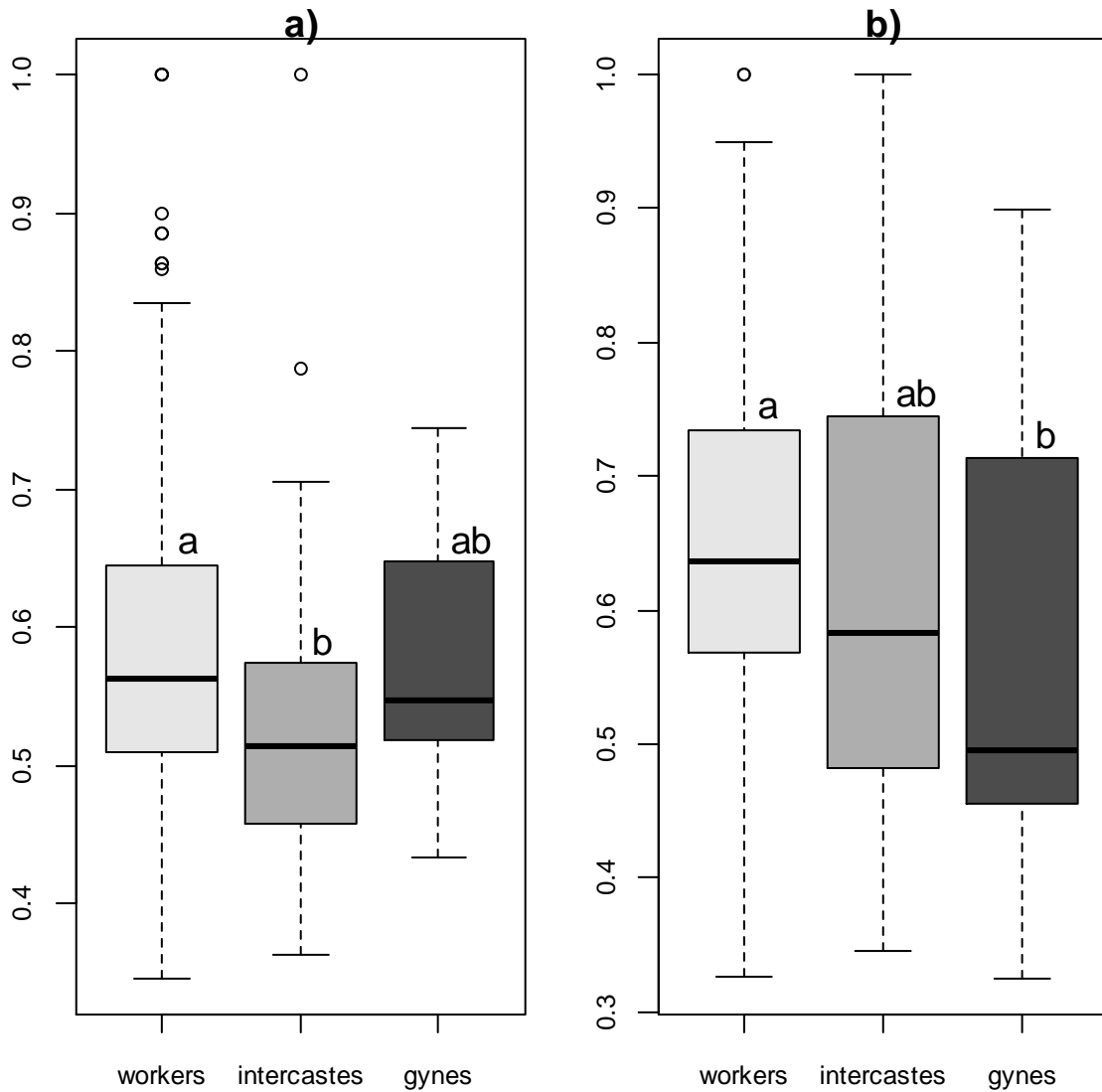


Figure 3.4: Location specialization (a) and task specialization (b) for gynes (dark grey), intercastes (middle grey) and workers (light grey). a: Intercastes had a lower location specialization than workers but no differences were detected between gynes and workers and between gynes and intercastes. b: gynes had a lower task specialization than workers with intercastes having an intermediate level between gynes and workers. No significant differences were detected between workers and intercastes and between gynes and intercastes. Boxes represent median, quartiles and extreme values. Letters indicate significant differences between groups.

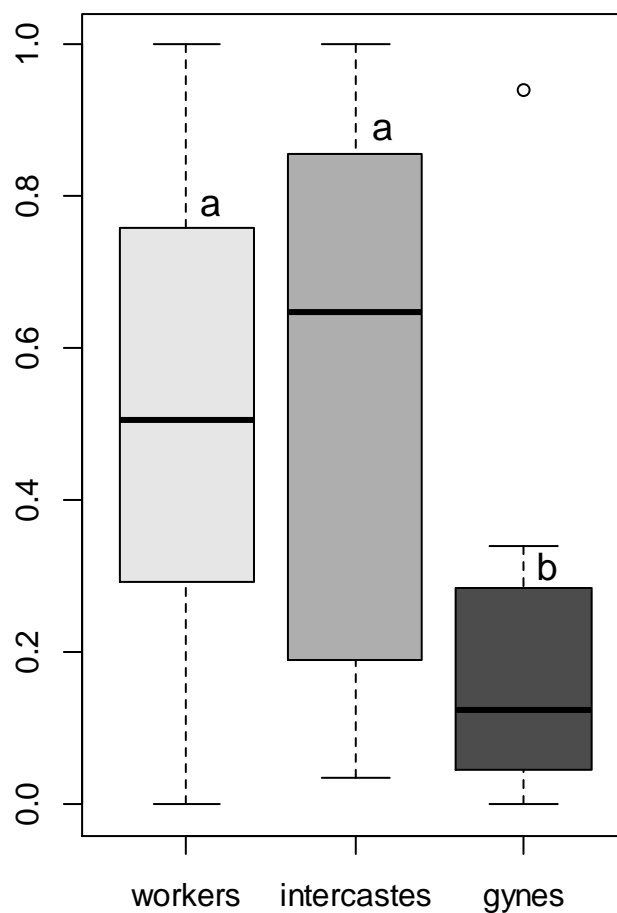


Figure 3.5: Dominance scores for gynes (dark grey), intercastes (middle grey) and workers (light grey). Gynes were significantly lower ranked than intercastes and workers. There was no difference in dominance score between intercastes and workers. Boxes represent median, quartiles and extreme values. Letters indicate significant differences between groups.

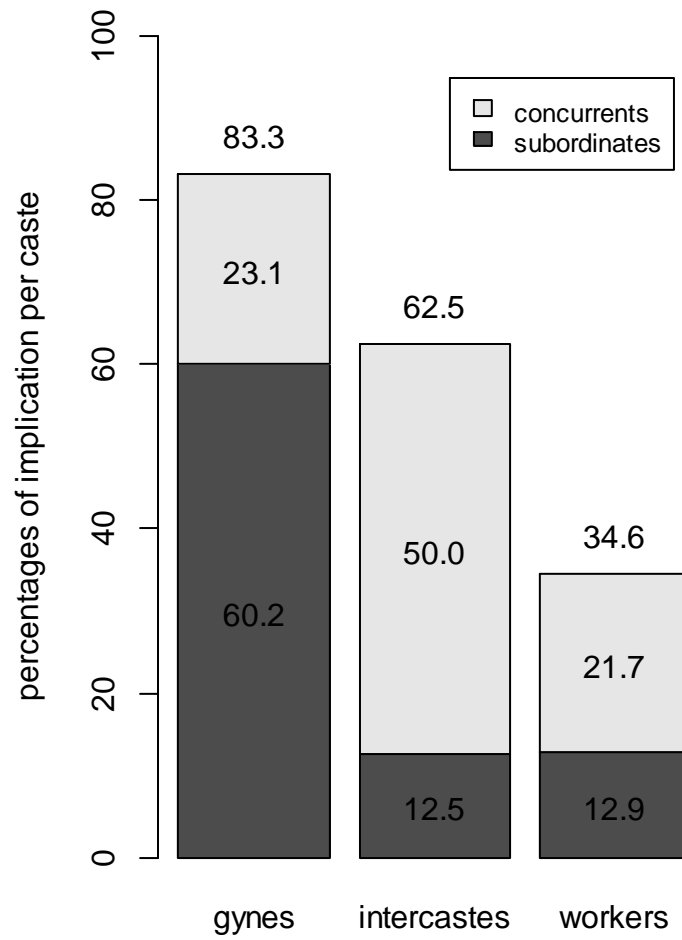


Figure 3.6: Percentages of individuals of each group (gynes, intercastes and workers) that were implicated in agonistic interactions. Light grey: percentages of dominant individuals (that won at least one contest) in a given group. Dark grey: percentage of subordinate individuals (that lost all contests) in a given group.

Tables

Table 3.1: Number of workers, gynes, queens, and intercastes in each colony.

| colonies | workers | gynes | queen | intercastes | total |
|----------|---------|-------|-------|-------------|-------|
| #574 | 70 | 0 | 1 | 6 | 77 |
| #637 | 63 | 1 | 0 | 9 | 73 |
| #647 | 55 | 5 | 0 | 10 | 70 |
| #654 | 84 | 6 | 0 | 7 | 97 |
| total | 272 | 12 | 1 | 32 | 317 |

Table 3.2: Ethogram of locations, tasks, and agonistic interactions (with associated violence coefficients) considered during scan samplings.

| locations | | |
|-------------------------------|-------------------------------|---------|
| B | in the brood | |
| P | in brood periphery | |
| N | in the nest (far from brood) | |
| E | at the nest entrance | |
| O | outside the nest | |
| tasks | | |
| b | brood care | |
| c | cleaning the nest | |
| g | grooming (given and received) | |
| w | walking (in the nest) | |
| f | foraging (walking outside) | |
| s | self-directed behaviors | |
| i | inactivity | |
| agonistic interactions | | |
| ab | antennal boxing | coef. 1 |
| mb | mandibles bite | coef. 2 |
| ch | coxal hit | coef. 3 |
| cs | causing escape | coef. 4 |
| ms | mandibles snap | coef. 4 |
| sa | sting attempt | coef. 5 |

Acknowledgments

This work was funded by a grant from Agence Nationale de la Recherche to MM and TM (project AntEvo ANR-12-JSV7-0003-01).

Données complémentaires

Une grande partie des individus ayant été utilisés à la fois pour les manipulations de comportement et pour les analyses morphométriques, il a été possible d'analyser les éventuels liens entre morphologie et comportement. Ces analyses (toutefois très préliminaires) montrent qu'une large proportion des individus dominants, indépendamment de leur caste, se retrouvent préférentiellement dans le couvain ou à proximité de celui-ci (Fig. 3.7). Cette relation confirme le lien entre dominance et accès à la reproduction. En revanche on ne trouve pas de corrélation entre la structuration spatiale et la taille des individus (Fig. 3.8).

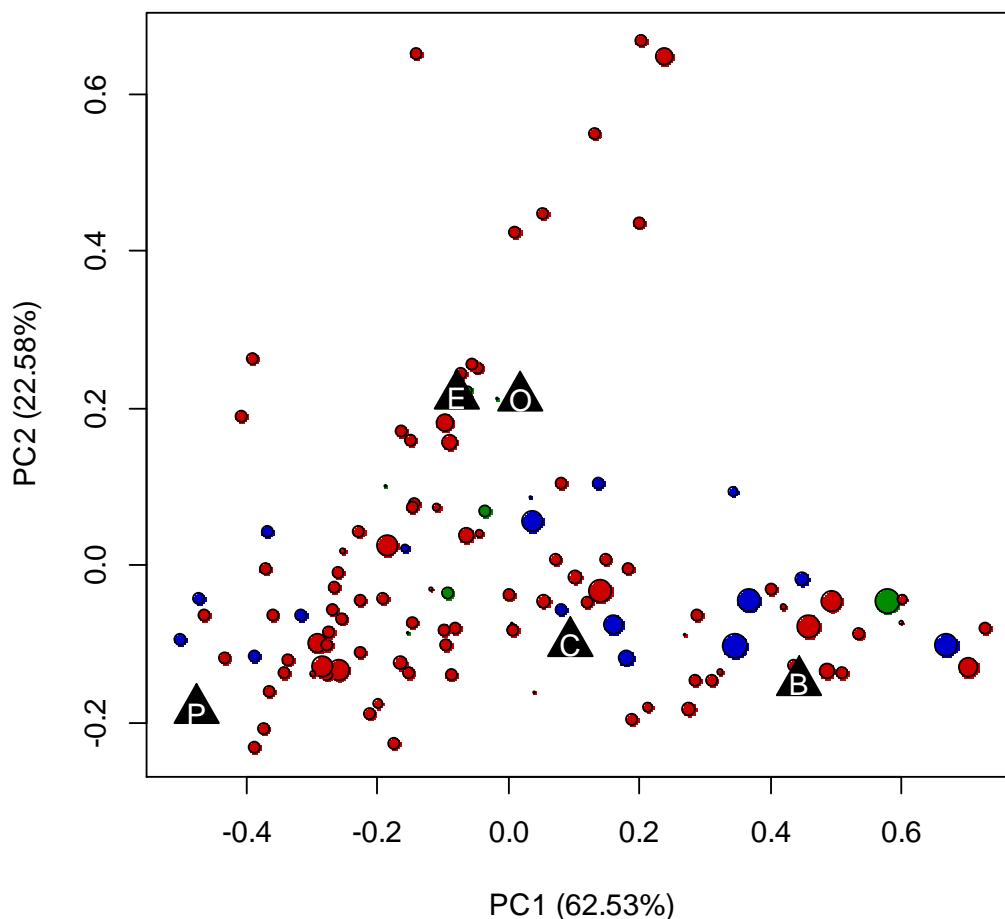


Figure 3.7 : Analyse des correspondances pour les localisations (location) en relation avec la dominance des individus (taille des cercles). Castes : gyènes (vert), ouvrières (rouge) et intercastes (bleu). Localisations: dans le couvain (B), en périphérie du couvain (C), dans le nid, loin du couvain (P), près de l'entrée du nid (E), et à l'extérieur du nid (O).

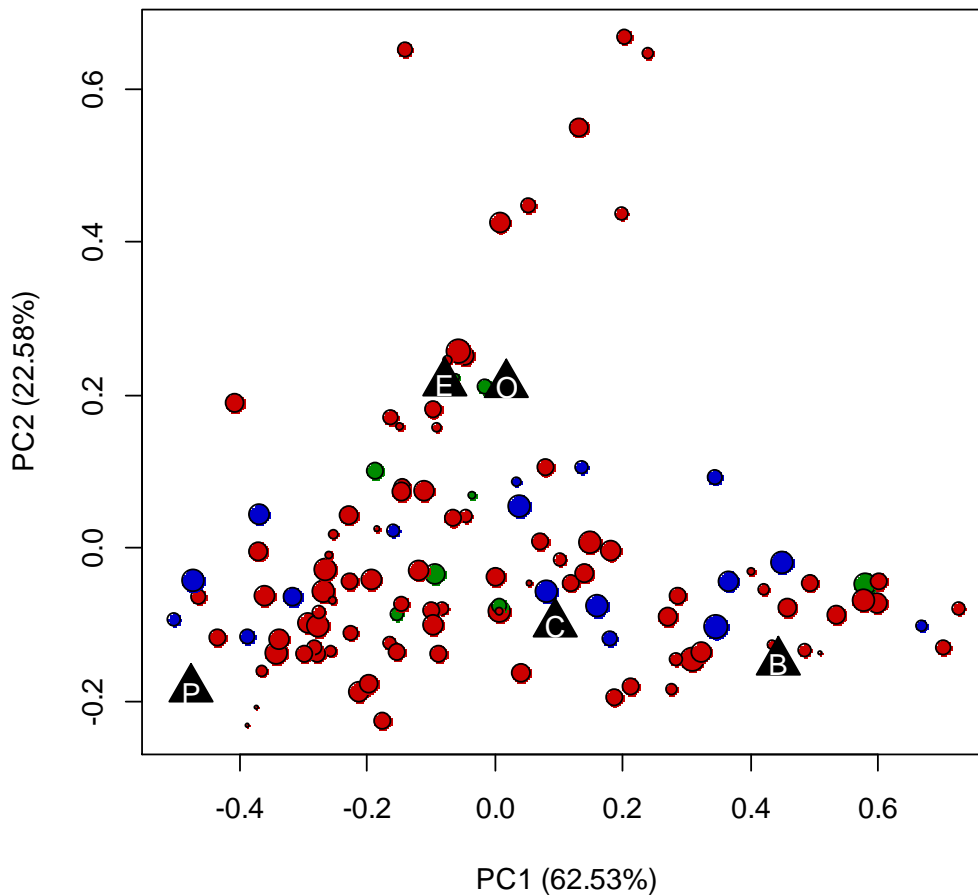


Figure 3.8 : Analyse des correspondances pour les localisations (location) en relation avec la taille des individus (taille des cercles). Castes : gynes (vert), ouvrières (rouge) et intercastes (bleu). Localisations: dans le couvain (B), en périphérie du couvain (C), dans le nid, loin du couvain (P), près de l’entrée du nid (E), et à l’extérieur du nid (O).

La relation entre la dominance et la taille des individus montre une augmentation de la variance des scores de dominance avec l’augmentation de la taille (Fig. 3.9). Ce résultat peut s’interpréter par le fait que les individus les plus grands ont aussi tendance à avoir un développement ovarien plus important (cf. corrélation entre taille et développement ovarien, partie IV, figure 4.7), et sont alors à la fois plus enclins à se battre pour avoir accès à la reproduction tout en étant aussi plus susceptibles d’être réprimés par les autres individus prétendant à la dominance et à la reproduction.

L’analyse des correspondances pour les tâches en relation avec les tailles des individus montre que les individus s’occupant du couvain sont tous relativement grands et que les petits individus se retrouve préférentiellement associés à la recherche de nourriture (*foraging*) et à l’inactivité (Fig. 3.10).

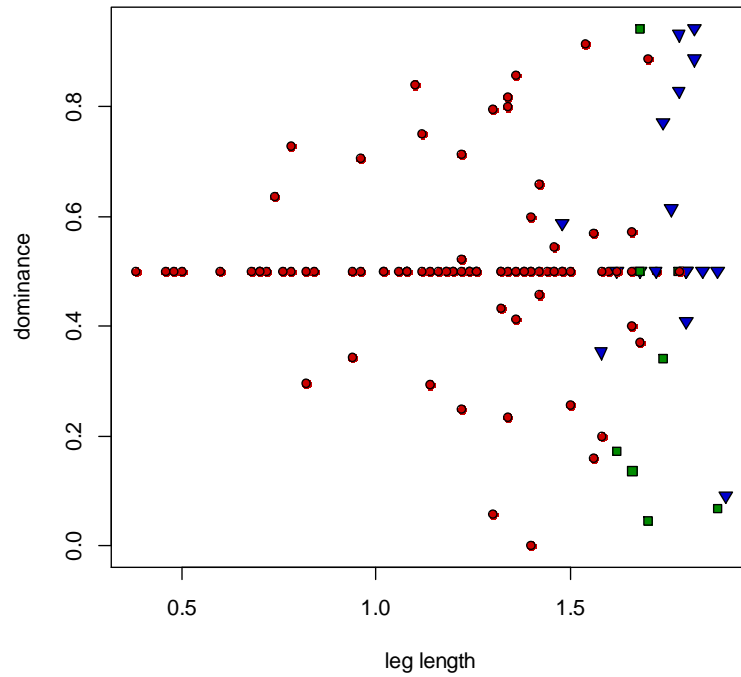


Figure 3.9 : Dominance des individus en fonction de leur taille (longueur des pattes). Castes : gynes (carrés verts), ouvrières (cercles rouges) et intercastes (triangles bleus). La valeur de dominance neutre de 0.5 est attribuée aux individus non impliqués dans des relations antagonistes.

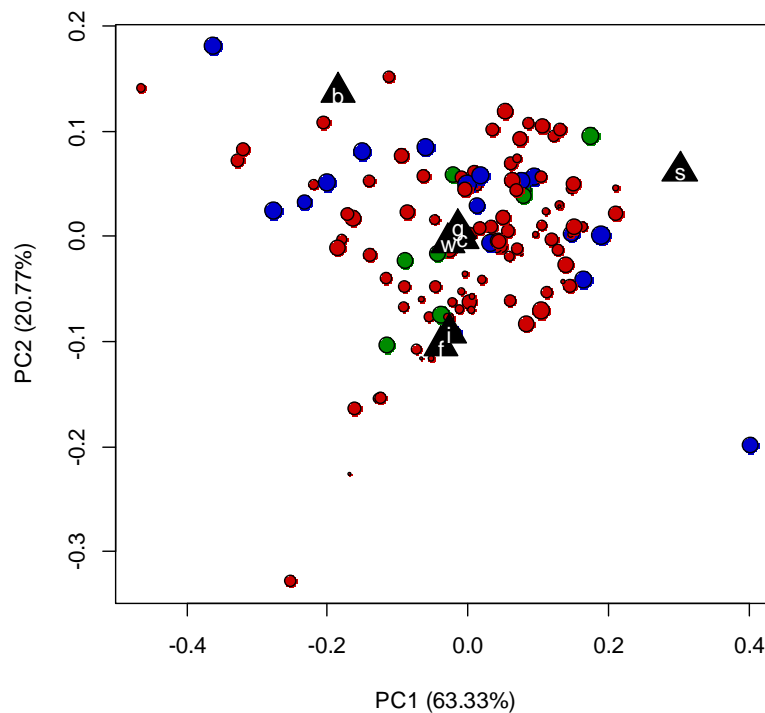


Figure 3.10 : Analyse des correspondances pour les tâches en relation avec la taille des individus (taille des cercles). Castes : gynes (vert), ouvrières (rouge) et intercastes (bleu). Taches : b) soins au couvain (*brood care*); c) entretien du nid (*cleaning*); g) toilette (*grooming*); w) déplacement (*walking*); f) recherche de nourriture (*foraging*); s) tâche "auto-ciblé" (*self-directed behaviors*); i) inactivité (*inactivity*).

On n'observe aucune corrélation significative entre les variables morphométriques (taille, queenlikeness globale, et mosaïcisme) et les variables comportementales de dominance et de spécialisation spatiale) (Fig. 3.11).

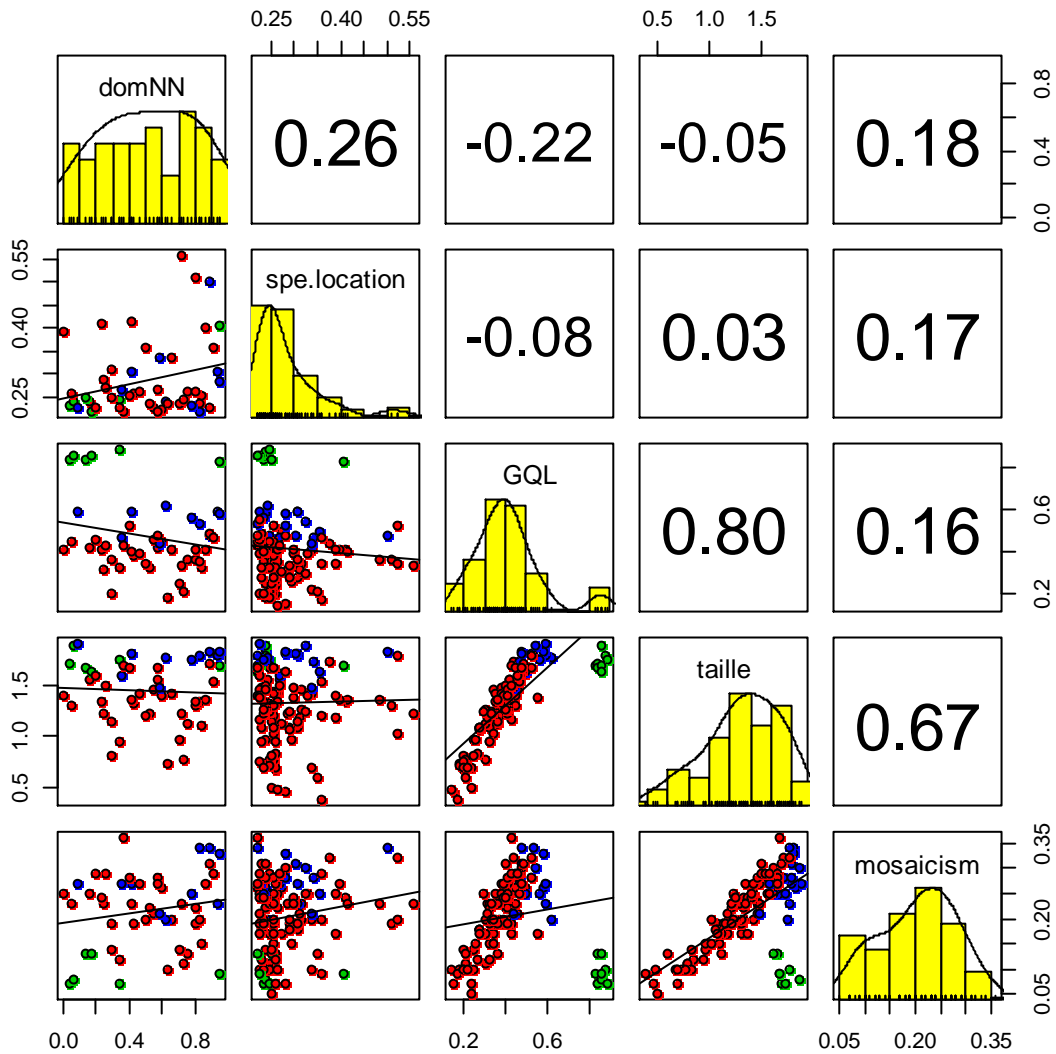


Figure 3.11 : Corrélations de type III entre paires de variables morphométriques et comportementales. Aucune des corrélations entre les paires de variables morphométriques (taille, queenlikeness globale, et mosaïcisme) et comportementales (dominance et de spécialisation spatiale) ne sont significatives. Castes : gynes (vert), ouvrières (rouge) et intercastes (bleu) ; bleu. Variables : dominance (domNN), spécialisation spatiale (spe.location), queenlikeness globale (GQL), longueur des pattes (taille) et mosaïcisme.

Pour conclure, les relations entre la morphologie et le comportement sont peu informatives. Le manque de corrélations significatives n'est cependant pas étonnant puisque d'une part les liens entre comportements et castes sont déjà assez faibles (cf. résultats de la partie III) et que d'autre part, les comportements sont très plastiques au sein de chaque caste.

IV-POTENTIEL EVOLUTIF DES PHENOTYPES INTERCASTES

Quand certains variants présentent des prédispositions particulières à la reproduction...

Introduction

L'hypothèse d'évolution par recombinaison développementale implique que certains phénotypes induits par des perturbations développementales soient associés à de nouvelles fonctions adaptatives pour qu'ils soient sélectionnés, et que la fréquence de leur production augmente suite au processus d'assimilation génétique (West-Eberhard 2005a). Dans le cas des fourmis, l'évolution potentielle de nouvelles castes implique donc que certaines intercastes puissent avoir une nouvelle fonction apportant un bénéfice colonial (ou exercent une fonction préexistante mieux que les autres) et ainsi entraîner une sélection des colonies les produisant (Molet et al. 2012). Afin d'évaluer la plausibilité de l'hypothèse selon laquelle des nouvelles castes de fourmis ont évolué à partir des intercastes, nous avons estimé le potentiel adaptatif des intercastes.

Etant donné le nombre de facteurs entrant en jeu et la nature non déterministe de beaucoup d'entre eux, il est illusoire de vouloir prédire à l'avance les trajectoires évolutives futures d'une espèce actuelle (Gould and Lewontin 1979; Gould 2002). Cependant, comme

les reines ergatoïdes ont évoluées un très grand nombre de fois de manière indépendante chez les fourmis (e.g. Cronin et al. 2013) et comme trois espèces de *Myrmica* présentent justement ce type d'individus reproducteurs, il est pertinent d'évaluer le potentiel des intercastes vis-à-vis des caractéristiques fonctionnelles des reines ergatoïdes. Les reines ergatoïdes sont associées à la reproduction par fondation dépendante qui est une stratégie qui est susceptible d'évoluer quand le taux de prédation des fondatrices solitaires est trop importants et rend la reproduction par fondation indépendante inefficace. Dans ces conditions, des reproductrices qui fondent une nouvelle colonie en partant de la colonie mère avec une partie des ouvrières qui les protègent et assurent la collecte de nourriture à l'extérieur du nid, ont des chances de succès bien supérieures aux reproductrices effectuant un vol nuptial et se retrouvant seule jusqu'à l'éclosion des premières ouvrières. Les reines ergatoïdes associent alors une forte fertilité, la possibilité de s'accoupler et un thorax aptère, ce qui limite les coûts énergétiques de leur production (e.g. une reine ergatoïde de *M. red* ne pèse que 5,95 mg contre 14,51 mg pour les reines ailées de *M. rogeri*; Molet et al. 2007a). Il a déjà été montré que les intercastes de *M. rogeri* présentent effectivement un thorax aptère morphologiquement plus proche de celui des ouvrières que de celui des reines (Londe et al. submitted). La question est alors de savoir de ce qu'il en est concernant leur fertilité et leur capacité à s'accoupler de manière à pouvoir pondre des œufs fécondés.

La capacité des intercastes à s'accoupler a été testée par des tests comportementaux permettant de mesurer l'attraction des mâles par les intercastes et favorisant l'observation d'accouplement éventuels. Nous avons également effectué un suivi extensif des colonies en laboratoire permettant l'observation éventuelle de comportements d'appel sexuel par les intercastes. L'appel sexuel est typique des reines ergatoïdes qui attirent les mâles à l'entrée du nid pour s'accoupler. Enfin, nous avons effectué un suivi de la ponte des individus ayant subi un accouplement. La fertilité des intercastes a été évaluée par le nombre d'ovarioles et d'oocytes, ainsi que la présence/absence et la taille de la spermathèque.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Nous avons disposé pour cette manipulation de l'ensemble des 40 colonies de *Myrmica rogeri* récoltés en Janvier 2013 dans la forêt tropicale humide Malgache

d'Amdrambovato (21°51'08''S, 47°40'99'E ± 200m, altitude: 1063 m). Du couvain de sexués était présent lors des récoltes dans 14 de ces 40 colonies et a donné lieu à des émergences de mâles et de gynes ailées sur une période s'étalant de janvier à mars. Les tests d'accouplement ont été effectués durant les mois d'avril et mai suivants. Les colonies présentaient alors en moyenne $4,2 \pm 5$ (sd) gynes, $9,3 \pm 11,2$ mâles, $47,8 \pm 17,2$ ouvrières et $0,6 \pm 1,4$ intercastes.

Tests d'accouplements

Considérant que les sexuées sont mature et physiologiquement apte à s'accoupler une fois qu'elles quittent le nid (Whitcomb et al. 1973; Bernadou and Heinze 2013), seuls les individus observés à l'extérieur des nids ont été utilisés pour les tests (contrainte de réceptivité). Étant donné que dans la majorité des espèces, les sexuées s'apparient à des partenaires issus d'autres colonies que la leur (ce qui est confirmé dans le cas de *Mystridium rogeri* par le fait qu'aucun accouplement au sein des colonies n'a été observé pendant toute la durée de l'élevage), nous avons utilisé pour chaque test, une femelle et un mâle issus de colonies différentes (contrainte de croisement). De manière à contrôler les effets « colonie », à chaque fois que possible, nous avons testé à la fois une gyne, une ouvrière et une intercastes issues de la même colonie (contrainte d'équilibrage). Seule les ouvrières de grande taille, similaire à celle des gynes et des intercastes ont été utilisées (contrainte de taille). Au total, 132 tests ont été réalisés, dont 42 avec des gynes, 44 avec des ouvrières et 46 avec des intercastes. En raison des contraintes de réceptivité, de croisement, d'équilibrage et de taille citées précédemment ainsi que de celle associée à une mortalité occasionnelle s'étalant sur la durée de l'ensemble des manipulations, l'échantillon effectif disponible pour effectuer ces 132 tests s'est réduit à 34 gynes, 31 ouvrières et 24 intercastes, chacune ayant été utilisée pour un ou deux tests (uniquement lorsque aucun accouplement n'a été constaté lors du premier test). Les mâles étant produits en plus grand nombre, nous avons pu utiliser un nouvel individu pour chaque test.

Chaque test a consisté à mettre en présence un mâle et une femelle vierge de l'un des groupes (gyne, ouvrière ou intercaste) dans une boîte de pétri de 5 cm de diamètre pendant 5 minutes. Tous les comportements notoires des deux individus ont alors été relevés à vue en direct. Les neuf comportements suivants ont été considérés :

-*self grooming* (sg): l'individu procède à un auto-toilettage sans se préoccuper de l'autre. Ce comportement s'observe chez les deux sexes.

-contact bref (cb) : l'individu focal touche l'autre du bout des antennes puis recule avec empressement. Ce comportement s'observe chez les deux sexes.

-contact intrusif (ci) : l'individu focal passe par-dessus l'autre et continue sa trajectoire. L'individu piétiné s'immobilise dans une posture de replis. Ce comportement s'observe principalement chez les mâles.

-posture agressive (pa) : l'individu focal se place face à l'autre en ouvrant les mandibules et tente de le pincer en cas d'approche. Ce comportement s'observe uniquement chez les femelles.

-fuite (fu) : suite à un contact bref ou intrusif, l'individu focal change brusquement de direction et cours prends la fuite sur une trajectoire de plusieurs cm. Ce comportement s'observe chez les deux sexes.

-frétillement (fr) : l'individu focal se met à frétiller sur place puis se met à courir en déployant ses ailes. Ce comportement est observé uniquement chez les mâles et est interprété comme un signe d'excitation sexuelle.

-poursuite (po) : l'individu focal cours derrière l'autre en adaptant ses changements à ceux du poursuivi. Comportement observé chez les deux sexes.

-tentative d'accouplement (ta) : le mâle se place sur la femelle et cherche à connecté ses pièces génitales à celle de la femelle.

-accouplement (ac) : connexion des pièces génitales des deux individus pendant plusieurs secondes.

A chacun de ces comportements ont été associés un coefficient d'attractivité de la femelle et un coefficient d'acceptation de la femelle. Ces coefficients multipliés par le nombre d'occurrence des différents comportements ont permis de construire pour chaque test, un indice d'attractivité de la femelle, qui reflète l'intérêt du mâle pour l'individu qui lui est proposé, et un indice d'acceptation de la femelle qui renseigne du degré avec lequel elle se laisse approcher par le mâle. Les moyennes des indices d'attractivité et d'acceptation sont comparées entre les groupes par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis.

Suivi de la ponte d'une intercaste

Une intercaste qui s'est accouplée lors d'un test a été replacée dans son nid d'origine et le devenir des larves de sa ponte a été observé pendant une durée de 6 mois. Le couvain de cette colonie a été considéré comme étant intégralement issu de cette intercaste puisque la colonie ne présentait ni de gyne, ni d'autre intercaste, et que les premiers œufs ont été observés quelques jours après l'accouplement. Certaines larves issues de sa ponte ont été séquencées afin de déterminer leur niveau d'hétérozygotie et en déduire leur mode de production. La parthénogenèse thélytoque étant *a priori* absente chez *Mystrium*, les larves seraient issues de reproduction sexuée si diploïdes et de parthénogenèse arrhénotoque si haploïdes. Les PCR ont été effectuées sur quatre primers. En effet, le déterminisme du sexe des hyménoptères sociaux étant haplo-diplophasique, des larves hétérozygotes sont diploïdes et donc issus d'œufs fécondés. Le transfert de sperme pendant l'accouplement vers la spermathèque aurait aussi pu être vérifié directement par dissection, mais le séquençage a été privilégié car il permettait de garder l'intercaste vivante dans l'éventualité d'une ponte de couvain viable jusqu'à l'éclosion. De plus, la dissection n'aurait pas permis de savoir si le sperme stocké dans la spermathèque avait ensuite été utilisé pour la fécondation, et que les œufs n'étaient pas issus de parthénogénèse.

Dissections

Une reine, 15 gynes, 33 intercastes et 86 ouvrières ont été disséquées. Les ovaires et la spermathèque de ces 135 individus ont été observés au microscope. Le nombre d'ovarioles et le nombre d'oocytes ont été relevés ainsi que la surface (sur une vue en 2D) de la spermathèque des individus qui en présentaient.

Résultats

Tests d'accouplements

Au total, les 132 tests d'accouplement effectués, ont donné lieu à 61 tentatives d'accouplement réparties sur 22 tests, et un accouplement réussi entre un mâle et une intercaste. Les tests impliquant des gynes ont donné lieu en moyenne à 0,8 tentative d'accouplement contre 0,5 et 0,1 tentative d'accouplement pour les tests ayant impliqué des

intercastes et des ouvrières respectivement (Fig. 4.1 gauche). En moyenne, les gynes et les intercastes ont subi respectivement une et 1,1 tentatives d'accouplement alors que les ouvrières en ont subi que 0,1 (Fig.4.1 droite).

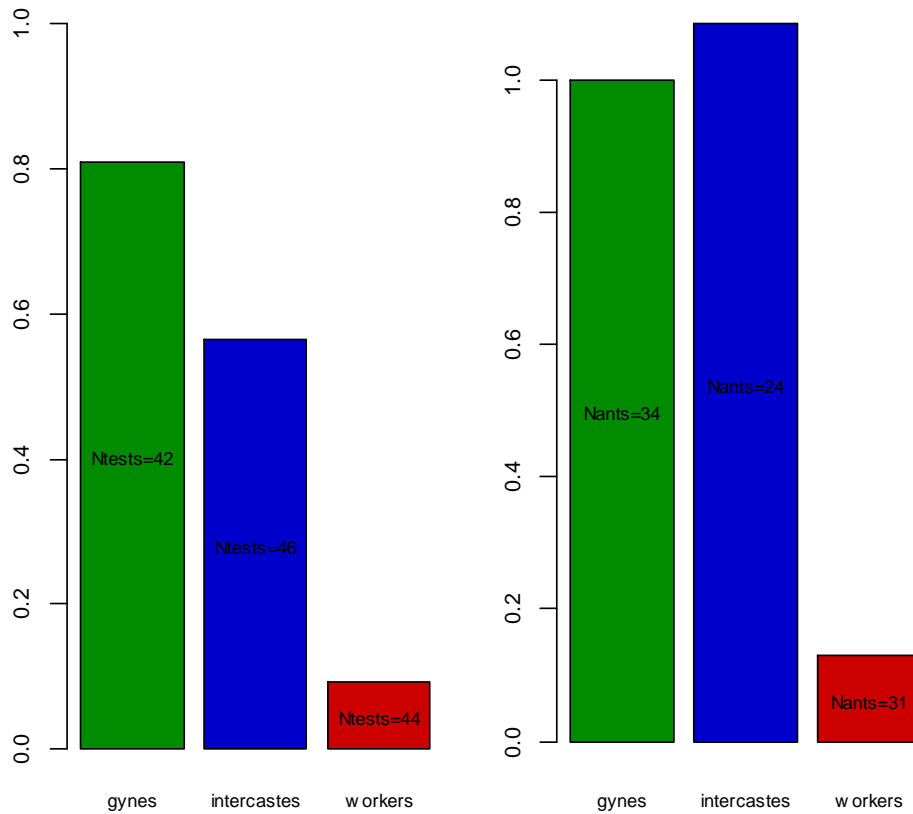


Figure4.1 : Gauche : nombre moyen de tentatives d'accouplement par test dans chaque groupe (gynes, intercastes et ouvrières). Droite : nombre moyen de tentatives d'accouplement par femelle testée dans chaque groupe.

Parmi les tests ayant donné lieu à au moins une tentative d'accouplement, dix ont concerné des gynes (soit 24% des tests impliquant une gyne), neuf d'entre eux, des intercastes (19%) et trois d'entre eux ont concernés des ouvrières (07%) (Fig4.2 gauche). 29% des gynes ont subi au moins une tentative d'accouplement, contre 37% pour les intercastes et 9% pour les ouvrières (Fig. 4.2 droite).

Le test de Kruskal-Wallis sur les distributions du nombre de tentative d'accouplement par test montre que les tests avec les gynes et les intercastes ont donné lieu à plus de tentatives d'accouplement qu'avec les ouvrières (gynes/intercastes: $\text{Chi}^2 = 0.226$, $P = 0.63$; gynes/ouvrières: $\text{Chi}^2 = 5.299$, $P = 0.02$; intercastes/ouvrières: $\text{Chi}^2 = 3.479$, $P = 0.06$) (Fig. 4.3).

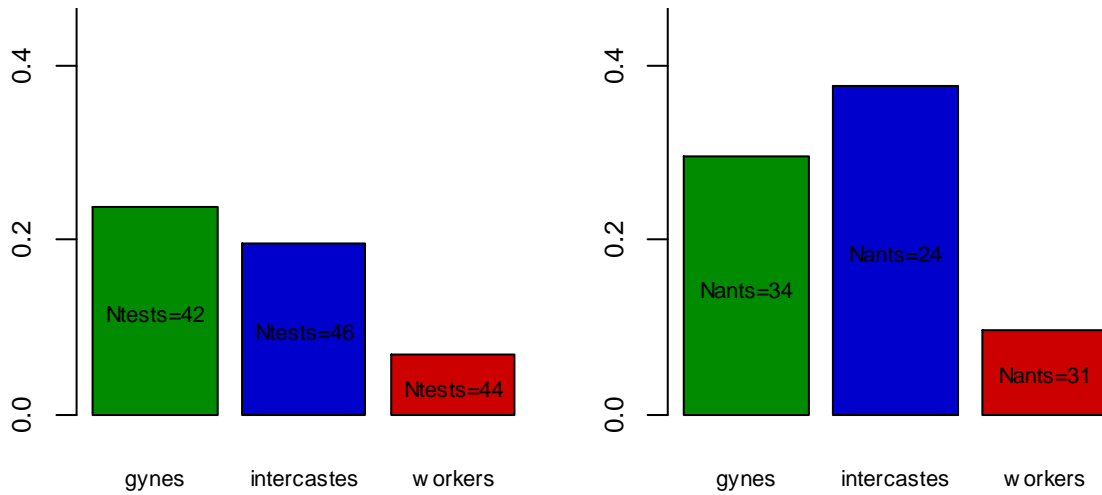


Figure 4.2 : Gauche : fréquence de tests donnant lieu à au moins une tentative d'accouplement, pour chaque groupe (gynes, intercastes et ouvrières). Droite : fréquence d'individus testés ayant subis au moins une tentative d'accouplement, pour chaque groupe.

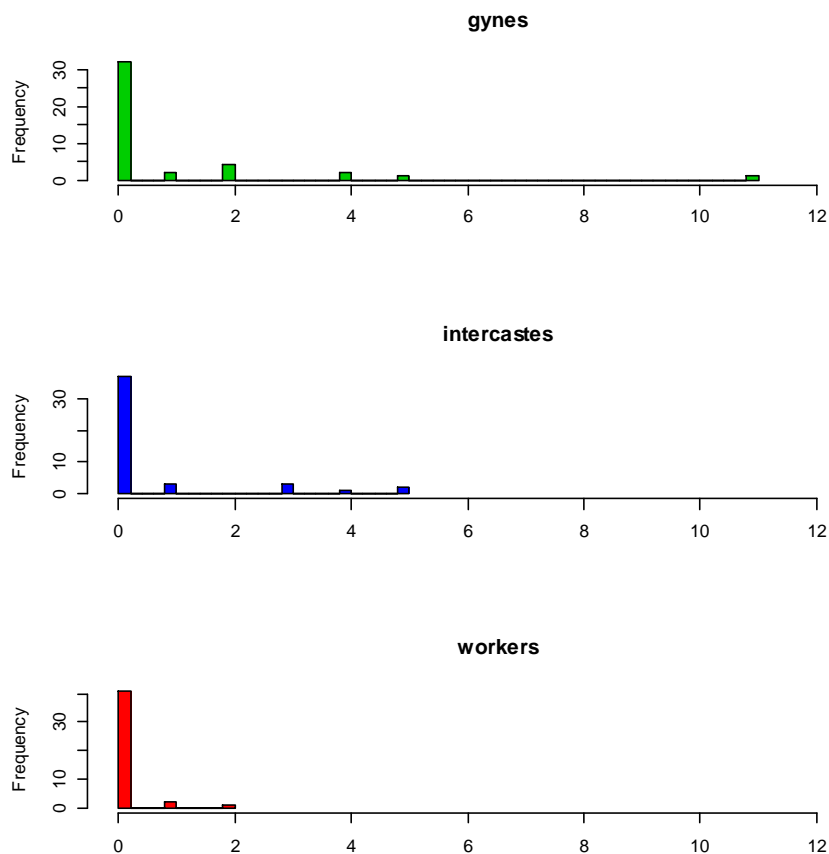


Figure 4.3 : Distribution du nombre de tentatives d'accouplements par test pour les gynes, les intercastes et les ouvrières.

Il n'y a pas eu de différence d'attractivité des femelles entre les gynes, les intercastes et les ouvrières (gynes/intercastes: $\chi^2 = 0.063$, $P = 0.80$; gynes/ouvrières: $\chi^2 = 1.648$, $P = 0.20$; intercastes/ouvrières: $\chi^2 = 2.875$, $P = 0.09$) (Fig. 4.4 gauche). Par contre, les gynes ont été significativement plus coopérative que les intercastes et les ouvrières (gynes/intercastes: $\chi^2 = 4.834$, $P = 0.03$; gynes/ouvrières: $\chi^2 = 16.650$, $P < 10^{-5}$; intercastes/ouvrières: $\chi^2 = 2.520$, $P = 0.11$) (Fig. 4.4 droite).

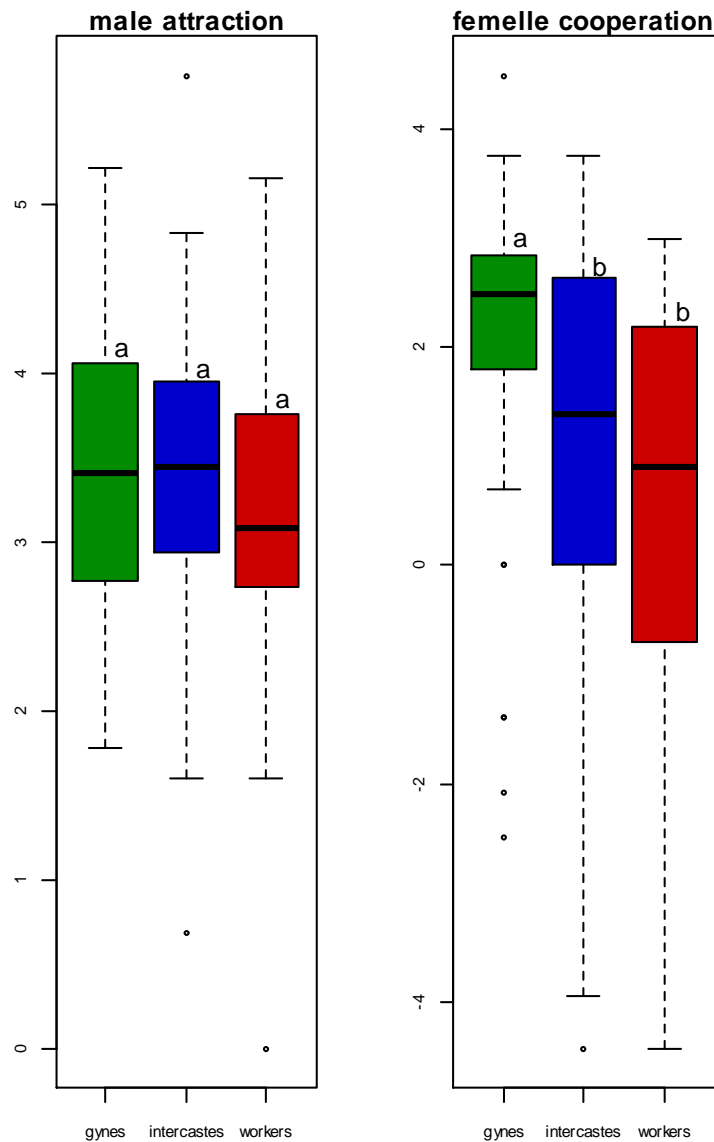


Figure 4.4: Distribution par groupe (gynes, intercastes et ouvrières) de l'indice d'attractivité des femelles (gauche), de l'indice de la coopération des femelles (droite).

Suivi de la ponte de l'intercaste accouplée et observations

L'intercaste qui s'était accouplé pendant les tests de la manipulation précédente a été replacée dans sa colonie initiale (une colonie sans reine) et elle s'est mise à pondre 10 jours plus tard. Les œufs se sont développés en larve de différents stades sans jamais arriver jusqu'au stade de nymphe. La PCR sur l'ADN des larves issues de cette ponte a montré une hétérozygotie sur 3 des 4 loci microsatellites, confirmant la fécondation des œufs.

Une intercaste a été observée en train de faire de l'appel sexuel à l'entrée de son nid (Fig. 4.5). Malheureusement l'élevage ne comprenant aucun mâle à cette période, l'effet de ce comportement vis-à-vis des mâles n'a pas pu être observé.



Figure 4.5 : Appel sexuel par une intercaste à l'entrée du nid.

Taille de la spermathèque, nombre d'ovarioles et d'oocytes

La spermathèque a été trouvée sur 81% des individus, sans distinction entre les gynes, intercastes et ouvrières ($\chi^2 = 0.949$, $P = 0.81$). Lorsqu'elle n'a pas été trouvée, cela

était plus probablement du à une perte pendant la dissection qu'à une réelle absence. La surface de la spermathèques était positivement corrélée au log de la taille des individus (pente = 0.045, $t = 7.187$, $p = 10^{-10}$), et les ouvrières avaient des spermathèques plus petites que les gynes et que les intercastes (gynes/intercastes: $\text{Chi}^2 = 1.813$, $P = 0.18$; gynes/ouvrières: $\text{Chi}^2 = 14.804$, $P = 10^{-4}$; intercastes/ouvrières: $\text{Chi}^2 = 11.322$, $P = 8 \times 10^{-4}$) (Fig. 4.6).

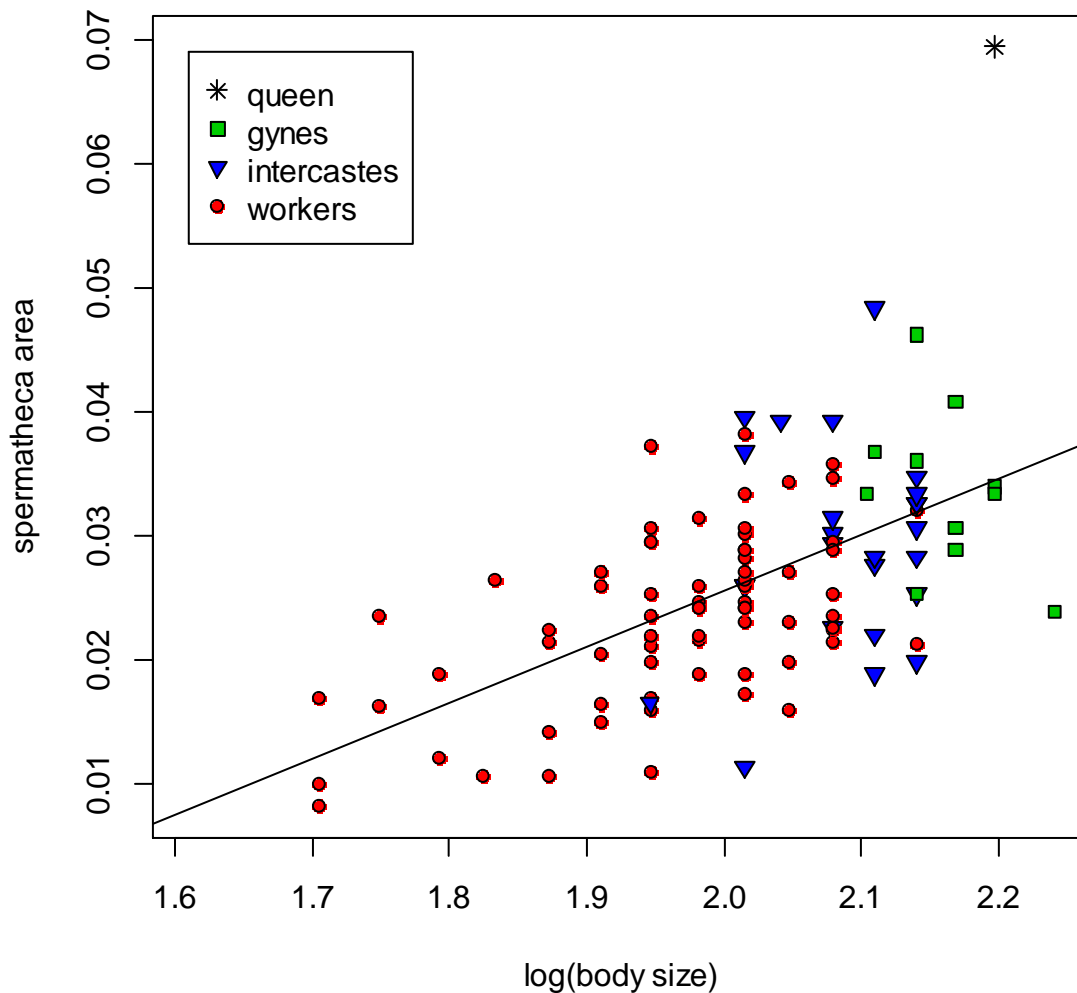


Figure 4.6 : Aire de la spermathèque (vue en 2D) en fonction de la taille et de la caste des individus. Régression linéaire : pente = 0.045, $t = 7.187$, $p = 10^{-10}$. La spermathèque de la reine est plus grosse que celles des gynes car elle est pleine de sperme tandis que celles des gynes sont vides.

Les dissections n'ont pas montré de différence dans le nombre d'ovarioles chez les gynes, les intercastes et les ouvrières ($\text{Chi}^2 = 0.661$, $P = 0.64$).

Les ovaires des intercastes contenaient plus d'oocytes que ceux des ouvrières (gynes/intercastes: $\text{Chi}^2 = 1.904$, $P = 0.34$; gynes/ouvrières: $\text{Chi}^2 = 0.039$, $P = 0.84$; intercastes/ouvrières: $\text{Chi}^2 = 4.628$, $P = 0.03$) (Fig. 4.7).

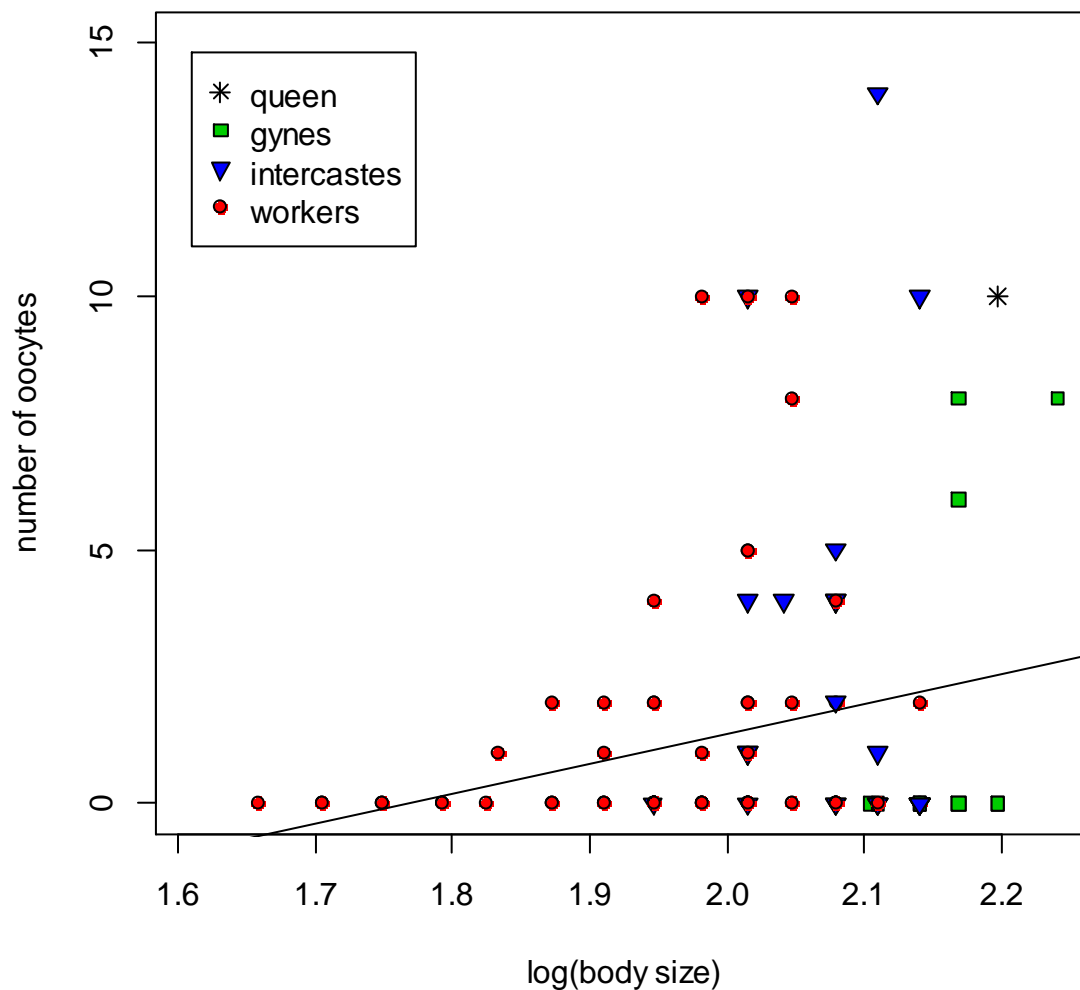


Figure 4.7 : Nombre d'oocytes en fonction de la taille et de la caste des individus. Régression linéaire : pente = 5.95, $t = 2.731$, $p = 0.007$.

Discussion

Les tests d'accouplement ont montré que les mâles peuvent être attirés sexuellement par des intercastes, et que des accouplements d'intercastes sont possibles. De plus, des intercastes peuvent présenter des comportements favorisant l'accouplement, comme le montre l'observation d'une intercaste faisant de l'appel sexuel. Les dissections ont révélé que chez *M. rogeri*, tous les individus ont une spermathèque, ce qui permet, en cas d'accouplement d'une intercaste, le stockage du sperme et une ponte d'œufs fécondés. L'ensemble de ces résultats suggère que les intercastes ont un potentiel reproducteur relativement fort comparé à celui des ouvrières et qu'elles présentent des comportements typiquement associés à la reproduction par fission coloniale (Peeters and Molet 2010).

Ni les tests d'accouplements, ni les dissections n'ont révélés de différences qualitatives entre les gynes et les ouvrières. Contrairement à nos attentes, certaines ouvrières ont donné lieu à des tentatives d'accouplements, et les ouvrières ne présentent pas moins d'ovarioles que les gynes et elles ont également une spermathèque comme dans de nombreuses espèces de Ponérines (Peeters 1991a). Le nombre de tentatives d'accouplement par test et par femelle, les indices d'acceptation des femelles, la quantité d'oocytes présents dans les ovaires et la taille de la spermathèque révèlent un continuum de variation entre les reines et les ouvrières avec des niveaux intermédiaires pour les intercastes.

La reproduction et la fondation d'une nouvelle colonie par fondation indépendante par une reine ailée telle que celles de *M. rogeri* implique plusieurs comportements stéréotypés tels que la sortie du nid pour le vol nuptial, le rassemblement dans des aires d'agrégation des sexués de différentes colonies, l'accouplement et la recherche d'un nouveau site pour fonder la nouvelle colonie (Hölldobler and Wilson 1990). Par opposition, dans les espèces pratiquant la DCF, les reines s'accouplent dans ou à proximité du nid en attirant les mâles par des phéromones sexuelle (Hölldobler and Wilson 1990; Cherix et al. 1991). De ce fait un changement de stratégie de reproduction tel que le passage de la fondation indépendante à la fondation par fission coloniale doit s'accompagner de changements notoires dans ces comportements (Peeters and Molet 2010). Les résultats de cette étude montrent que les intercastes, qui ne sont pas des individus présentant des

adaptations particulières ayant été spécifiquement sélectionnées mais plutôt des produits de conditions développementales anormales, sont susceptibles de présenter ces nouveaux comportements. Ces transitions comportementales sont vraisemblablement possibles parce qu'elles impliquent des traits comportementaux plus généraux similaires d'une stratégie à l'autre. Bernadou and Heinze (2013) ont montré que les comportements des reines étaient associés à des changements successifs au cours de leur vie dans leur phototaxie, leur géotaxie et leur activité locomotrice. Avant la période de maturité sexuelle, les reines ont une phototaxie négative et une activité locomotrice faible, ce qui les conduit à rester dans leur nid. Au moment de la maturité sexuelle, leur phototaxie devient positive, leur géotaxie devient négative et leur activité locomotrice augmente, les amenant à sortir du nid pour effectuer l'appel sexuel. Puis après la copulation, les reines retrouvent une basse activité locomotrice et une phototaxie négative, ce qui les conduit à regagner le nid. Ces changements ont été décrits chez une espèce où les reines effectuent l'appel sexuel à proximité du nid (Bernadou and Heinze 2013) mais on s'attend à ce qu'une sortie pour un vol nuptial soit conditionné par les mêmes variations comportementales, à savoir une augmentation de l'activité locomotrice, un fort phototropisme et un géotropisme négatif. Par conséquent, dans une espèce pratiquant la reproduction par fondation indépendante, des intercastes recombinaient divers degrés de caractères de reine et d'ouvrières sont susceptibles de sortir du nid au moment de la maturité sexuelle, de rester à proximité du nid du fait de leur inaptitude au vol, et de se faire féconder après avoir attiré des mâles par les mêmes phéromones sexuelles que les reines ailées utilisent lors des agrégations de sexués (Vander Meer and Alonso 1998).

Aucune des intercastes étudiées lors de cette étude n'a montré l'ensemble des comportements qui permettraient la fondation d'une nouvelle colonie, de la sortie du nid pour un accouplement spontané à l'émergence des premières ouvrières de sa ponte. Cependant, le fait d'avoir observé chez différents individus les différents aspects physiologiques et comportementaux associés à la reproduction par fission coloniale suggère que des intercastes présentant l'ensemble de ces caractéristiques existent dans la population naturelle, et qu'elles fondent de nouvelles colonies comme le feraient des reines ergatoïdes. Il suffirait alors que les conditions environnementales viennent à défavoriser la reproduction par fondation indépendante, par exemple par une hausse de la prédation sur

les reines seules, pour que la production d'intercastes présentant les caractéristiques des reines ergatoïdes soit sélectionnée. On aurait alors une canalisation des morphologies intercastes autour de valeur de traits morphologiques et comportementaux maximisant l'efficacité de la reproduction par fission coloniale et finalement l'évolution d'une nouvelle caste de reines ergatoïdes.

V- DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

Dans le but d'évaluer la plausibilité d'un scénario d'évolution de nouvelles castes de fourmis par recombinaison développementale, le travail effectué au cours de cette thèse s'est structuré en trois axes principaux: (i) confirmer que les intercastes produites spontanément chez *Mystrium rogeri* sont des individus mosaïques recombinaison de caractères de reine et des caractères d'ouvrière et montrer en quoi cette production est liée à la modularité et au polyphénisme qui sont des caractéristiques fondamentales chez les fourmis; (ii) étudier le comportement d'un échantillon conséquent d'intercastes afin de voir si le mosaïcisme morphologique s'accompagne d'un mosaïcisme comportemental, de déterminer si elles constituent des variants diversifiés et d'évaluer les coûts éventuels de leur production pour la colonie ; (iii) évaluer le potentiel évolutif des intercastes vis-à-vis de la fonction de fondation par fission coloniale, qui constitue une stratégie ayant évolué à de multiples reprises chez les fourmis.

Origine de la production d'intercastes

Le premier axe, basé sur une approche morphométrique, a permis de montrer que les intercastes sont bien des mosaïques de caractères de reine et de caractères d'ouvrière

vis-à-vis de traits morphométriques quantitatifs alors que le mosaïcisme des intercastes avait pour l'instant essentiellement été montré sur des caractères qualitatifs parmi lesquels la présence/absence de moignons ou de traces d'insertions alaires et de sclérites de vol segmentés, ou encore le nombre d'ocelli et d'ovarioles (Plateaux 1970; Peeters 1991b). La construction d'un indice de mosaïcisme a rendu possible la quantification du degré de recombinaison de caractères de reine et d'ouvrière chez tous les individus et de voir que les individus n'ayant pas été classés comme intercastes sur la base des traits qualitatifs présentent quand même divers degrés de mosaïcisme sur les caractères quantitatifs.

Les différents modules développementaux (tête, pronotum, mésonotum, propodéum, pattes et gastre) ont des normes de réactions différentes et ces différences de formes expliquent directement le mosaïcisme. Des niveaux de facteurs environnementaux intermédiaires induisent à la fois le développement d'une structure de type reine pour certains modules et une structure de type ouvrière pour d'autres modules. Par conséquent, les combinaisons possibles de mosaïques sont limitées par la forme des normes de réactions. Comme les normes de réactions des modules thoraciques induisent la production de structure de type reine pour des niveaux de facteurs environnementaux plus élevés que dans le cas des normes de réactions des pattes, de la tête, et du gastre, les intercastes produites recombinent nécessairement un thorax de type ouvrière avec une tête, des pattes et un gastre de type reine. Ces conclusions sont concordantes avec les résultats d'Okada et al. (2013) qui constatent une hiérarchisation dans l'expression des caractères de type reine et de type ouvrière chez les intercastes de *Temnothorax nylanderi*. Notre étude montre donc que la production d'intercastes est directement liée à la modularité et au polyphénisme qui permettent des réponses plastiques différentes entre les parties de l'organisme. De ce fait, une production résiduelle d'intercastes est susceptible d'exister chez toutes les autres espèces de fourmis présentant un dimorphisme reine ouvrière. Certaines espèces de Ponérines ne présentent pas de reines et la reproduction est assurée par des gamergates (Peeters 1991a). Cependant ces espèces ont perdu secondairement leurs reines au cours de l'évolution et elles ont probablement conservé une partie des déterminants génétiques d'une plasticité ancestrale et peuvent vraisemblablement produire aussi de tels phénotypes recombinants.

Coûts et bénéfices de la production d'intercastes

Le deuxième axe a montré que les intercastes présentent des profils comportementaux cohérents vis-à-vis des tâches accomplies normalement par les reines et les ouvrières. Les intercastes sont alors actives et fonctionnelles au sein des colonies. Ces résultats vont dans le sens de l'argument avancé par West-Eberhard (2003) puis par Molet et al. (2012) selon lequel, les variations phénotypiques issues de la recombinaison développementale ont moins de chance d'être désavantageuses que celles produites par des mutations génétiques aléatoires. En effet, comme les intercastes sont des variants induits par des facteurs environnementaux, elles ne vont exprimer que des comportements faisant déjà partie du répertoire développemental des reines ou des ouvrières, qui ont déjà été testés par la sélection naturelle. Cet argument, valable aussi bien pour les traits morphologiques, comportementaux et physiologiques, avance que l'évolution par recombinaison développementale est susceptible de permettre une adaptation rapide des organismes, étant donné qu'elle implique de la variation dirigée par les adaptations passées, à la différence de la variation mutationnelle qui est aléatoire, non dirigée et par conséquent essentiellement délétère (David and Samadi 2011).

Les relevés des interactions antagonistes au sein des colonies ont montré que les intercastes étaient plus impliquées que les ouvrières dans les conflits physiques. De ce fait, la production d'intercastes a un coût global pour la colonie puisque de tels conflits induisent une dépense énergétique significative et réduisent l'efficacité des ouvrières (Cole 1986; Monnin and Ratnieks 1999). Ces coûts contribuent probablement à maintenir la production d'intercastes relativement basse.

Potentiel évolutif des intercastes

Les différentes manipulations et observations du troisième axe suggèrent que certaines intercastes sont aptes à s'accoupler. Même si nous n'avons pas observé chez un seul individu l'ensemble des comportements permettant la reproduction d'une intercaste, il est probable que dans la nature, sur la population entière, des intercastes présentent individuellement toute la séquence comportementale comprenant l'appel sexuel, l'attraction des mâles (à très courte distance), l'accouplement et la production d'œufs fécondés et viables. De tels individus peuvent théoriquement permettre la reproduction par

fission de colonie mais également qu'une intercaste succède au statut de reproducteur après la perte de la reine d'une colonie (Peeters and Hölldobler 1995). Ces deux stratégies de reproduction sont susceptibles d'être très fortement sélectionnées, dès lors qu'un changement environnemental rend la fondation indépendante inefficace (Heinze and Tsuji 1995). En conséquence, on peut considérer que des espèces produisant une faible proportion d'intercaste telles que *Mystrium rogeri* sont en situation de stratégie de reproduction mixte, l'une d'entre elles – la fondation par fission coloniale – n'existant que de manière résiduelle. Ces espèces peuvent alors très facilement s'adapter à de nouvelles contraintes environnementales en changeant de stratégie de fondation par un ajustement des seuils de réponses développementales aux facteurs environnementaux. La présence de reines ergatoïdes chez *M. oberthueri* (Molet et al. 2007b, 2009), *M. 'red'* (Molet et al. 2007a, 2009) et *M. mysticum* (Molet et al. 2009) rend particulièrement parcimonieux ce scénario d'évolution de nouvelles castes à partir de la production d'intercastes chez les espèces ancestrales du genre *Mystrium*. A une échelle phylogénétique plus large, le potentiel évolutif de la recombinaison développementale, en permettant une adaptation rapide du mode de fondation, peut rendre compte à la fois du nombre d'évolution indépendante de la reproduction par fission coloniale (Cronin et al. 2013) mais aussi du succès évolutif des fourmis en terme de longévité des lignées phylogénétiques (Wilson 1987).

En raison de l'existence d'autres espèces de *Mystrium* présentant des reines ergatoïdes (Molet et al. 2009), le travail effectué pendant cette thèse a volontairement été centré sur la correspondance entre les caractéristiques des intercastes et celles des reines ergatoïdes. Cependant, l'évolution par recombinaison développementale a certainement joué aussi un rôle important dans l'évolution des soldats qu'on retrouve dans plus de 15 genres de fourmis (Peeters and Ito, données non publiées) et qui sont aussi des phénotypes mosaïques qui recombinent des modules et des règles de croissance allométriques de reine et d'ouvrière (Molet et al. 2012, 2014). Des manipulations (non montrées dans ce manuscrit) montrent que les intercastes de *M. rogeri* ont plus de chance que les ouvrières de gagner un combat contre un individu d'une autre espèce. Cet effet, associé à la taille des intercastes, plus grandes que la majorité des ouvrières, a pu entraîner la sélection de la production d'intercastes spécialisées dans la défense des colonies contre les agressions interspécifiques, aboutissant à l'évolution des castes de soldats.

Implications théoriques

L'évolution est classiquement vue comme une accumulation incrémentielle de mutations ayant de petits effets et entraînant le déplacement des espèces sur les reliefs du paysage adaptatif (Fig. 5.1 haut) (Fisher 1930; Orr 2000). Ce type d'évolution est fortement contraint par la présence de vallées entre les pics de fitness du paysage adaptatif, qui sont susceptibles de bloquer les déplacements des phénotypes d'un maximum local à un autre. Une particularité de l'évolution par recombinaison développementale est qu'elle est moins contrainte que l'évolution par accumulation incrémentielle, du fait de la contre-sélection qui pourrait affecter les phénotypes intermédiaires entre deux maximums de fitness (Fig. 5.1 bas). L'évolution d'une reine ergatoïde par modification graduelle du phénotype de reine ailée doit passer par des stades intermédiaires susceptibles d'être délétères. Par exemple, la production de reines effectuant la reproduction par fission coloniale tout en gardant la morphologie des reines ailées cumulerait à la fois les coûts importants associés à la production de ces morphologies et le coût de la division par deux du nombre d'ouvrières suite à la fission. On s'attend alors à ce que la production de telles reines soit contre-sélectionnée, empêchant la transition d'une stratégie à l'autre. L'évolution par recombinaison développementale, elle, permet la production de phénotypes associant directement la morphologie aptère avec des comportements compatibles avec la fission coloniale et de ce fait, elle n'est pas contrainte par la contre-sélection des phénotypes intermédiaires.

On trouve dans la littérature une virulente polémique concernant l'évolution des castes de soldats. Pour Ward (1997), les soldats ont évolué à partir des ouvrières alors que Urbani prétend qu'ils ont évolué à partir des reines (Urbani and Passera 1996; Urbani 1998), en se basant sur les similarités morphologiques entre les castes. Le scénario d'évolution par recombinaison développementale met en évidence que les arguments avancés pour les deux points de vues ne sont pas mutuellement exclusifs, puisque ces nouvelles castes de soldats peuvent tout aussi bien avoir évolué en recombinaison à la fois des morphologies et des règles de croissances provenant des reines et des ouvrières (Molet et al. 2012, 2014).

Du fait que la recombinaison développementale est initiée par l'exploitation des voies développementales impliquées dans la plasticité phénotypique, elle peut conduire à

l'expression d'un nouveau phénotype sans qu'il y ait remplacement des anciens. Alors qu'une pression de sélection directionnelle entraîne la modification des phénotypes moyens de toute la population, la recombinaison développementale peut initier des nouveaux phénotypes qui coexistent dans la population avec les phénotypes ancestraux. Ce modèle évolutif permet ainsi de rendre compte à la fois de l'évolution des espèces mais aussi de l'évolution des polymorphismes. Le cas de l'évolution des soldats qui forment une caste supplémentaire qui s'ajoute à celles des reines et des ouvrières en est un bon exemple. Cette propriété est particulièrement importante parce qu'elle permet ce que l'on pourrait appeler une 'duplication fonctionnelle' par analogie au phénomène de duplication génétique (Ohno 1970; Taylor and Raes 2004). En effet, dans le cas de *Myrmica ruginodis* les résultats présentés dans cette thèse montrent que des intercastes présentent potentiellement l'ensemble des caractéristiques associées à la fondation par fission coloniale. La sélection pour ce type de fondation peut alors permettre l'évolution de cette stratégie tout en maintenant la fondation indépendante tant que les morphologies de type reine ergatoïde ne sont pas suffisamment stabilisées. Le remplacement des reines ailées par une production exclusive de reines ergatoïdes ne subvient alors que dans un second temps, lorsque, suite au modelage des phénotypes des reines ergatoïdes par la sélection naturelle, la performance de la fondation par fission coloniale est suffisamment plus efficace que la fondation indépendante.

La recombinaison développementale apparaît ainsi d'un point de vue théorique, comme un modèle évolutif complémentaire à celui de l'évolution graduelle par une accumulation de petites mutations. En recyclant des composantes des adaptations ancestrales, ce mode d'évolution est peut-être plus conservateur que le processus de mutations aveugles, mais il est cependant susceptible de faciliter l'adaptation rapide à des changements d'environnementaux. L'ensemble des résultats obtenus pendant cette thèse suggère, sans nier l'action conjointe des autres processus évolutifs, que la recombinaison développementale est un mécanisme jouant un rôle important dans l'évolution et la diversification des systèmes de castes chez les fourmis.

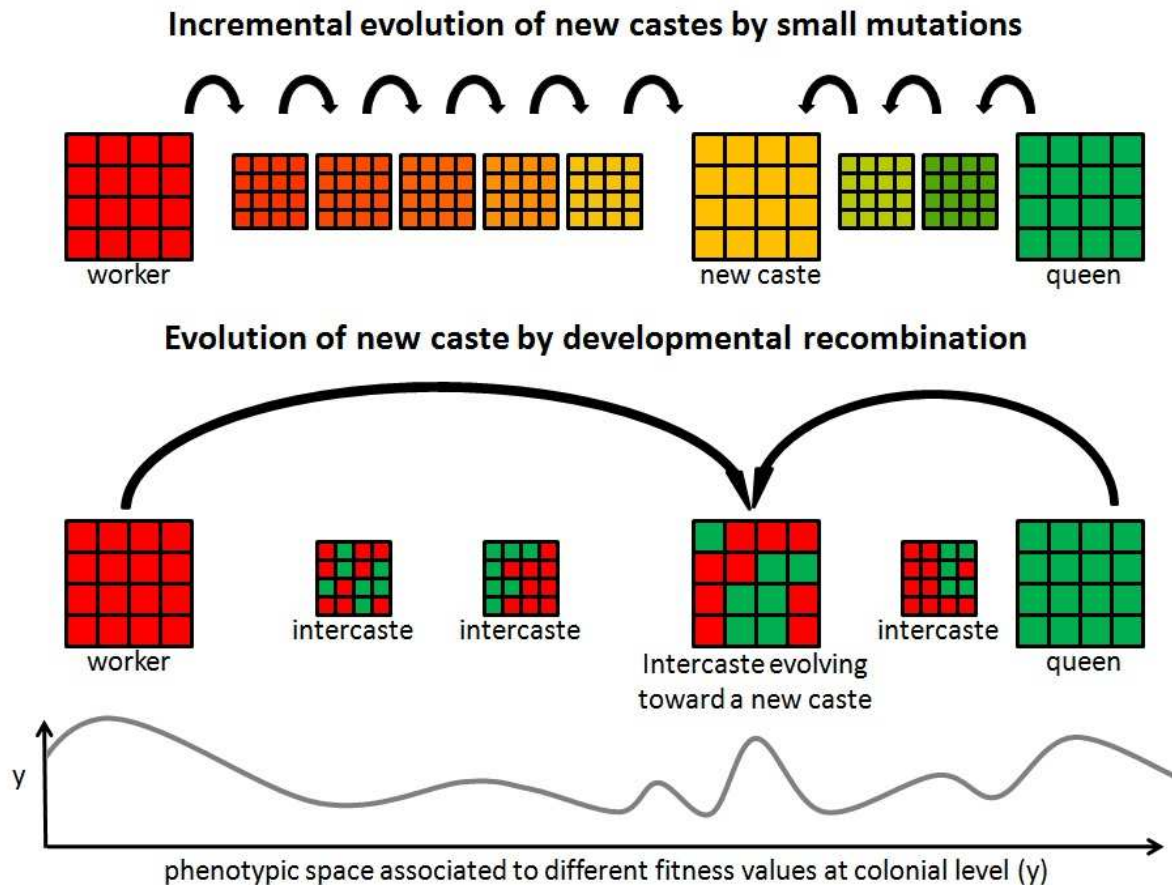


Figure 5.1 : Comparaison du modèle d'évolution incrémentielle et du modèle d'évolution par recombinaison phénotypique. Les castes initiales des reines et des ouvrières sont associées à des maximums relatifs de fitness coloniale (la morphologie des ouvrières n'est adaptative que si la colonie produit également des phénotypes de reines et *vice versa*). Selon le modèle classique d'évolution par accumulation incrémentielle de petites mutations, une nouvelle caste peut résulter de l'évolution graduelle des phénotypes à partir de l'une des castes préexistantes (en haut). Dans ce modèle, la topologie du paysage adaptatif contraint fortement les possibilités d'évolution du fait de la contre-sélection des phénotypes intermédiaires. Selon le modèle d'évolution par recombinaison développementale, un phénotype associé à un nouveau pic de fitness coloniale peut être obtenu directement par la réorganisation des voies développementales impliquées initialement dans la production des phénotypes alternatifs préexistants (en bas). Ce mode d'évolution n'est pas contraint par la contre-sélection des phénotypes intermédiaires. L'évolution par recombinaison développementale est initiée par une production de phénotypes mosaïques (intercastes) suite à des perturbations génétiques ou environnementales qui affectent le développement. Les phénotypes mosaïques sont alors soumis à la sélection qui entraîne l'accommodation génétique du changement (West-Eberhard 2005a; Molet et al. 2012).

Perspectives

Selon le modèle d'évolution par recombinaison développementale, des nouveautés évolutives peuvent résulter de la production de phénotypes recombinants en réponse à des facteurs environnementaux. L'augmentation en fréquence des phénotypes initialement induits par des facteurs environnementaux est possible, parce que pendant le processus d'assimilation génétique, la sélection agit sur les déterminants génétiques des seuils de réponses et de la forme des normes de réactions du développement. Cependant, dans le cas particulier des fourmis, un autre élément est susceptible de favoriser l'évolution des phénotypes. Il s'agit du fait qu'une partie des facteurs environnementaux impliqués dans le déterminisme des castes pourraient être eux même en partie héritable et soumis à la sélection, à l'échelle de la colonie, par le biais des comportements des ouvrières. Parmi ces facteurs, on peut citer l'apport nutritionnel (Wheeler 1986), la température d'incubation (Gösswald and Bier 1957), l'exposition aux phéromones (Brian and Hibble 1963; Vargo and Fletcher 1986) et les interactions physiques entre les larves et les ouvrières (Brian 1973; Penick and Liebig 2012). Il ne s'agit pas d'une exposition à un environnement externe aux fluctuations aléatoires mais plutôt d'un contrôle social dans lequel les ouvrières déterminent les paramètres d'exposition des larves en contrôlant les flux alimentaires et en plaçant le couvain à différentes profondeurs dans le nid. Le comportement des ouvrières, aussi plastique soit-il, étant lui-même sujet à une influence génétique héritable (Cairns et al. 1990; West-Eberhard 2003), la sélection peut alors entraîner une évolution des phénotypes par deux voies distinctes : (i) par la modification des normes de réactions et (ii) par la modification des profils comportementaux des ouvrières, entraînant ainsi une modification des facteurs environnementaux qui affectent la plasticité phénotypique des larves. Cette considération invite à concevoir la dichotomie entre « génétique = héritable » et « environnement = non-héritable » avec une certaine prudence et de manière générale, à distinguer l'environnement écologique (Williams 2008) de l'environnement interne ("microenvironnement" ou "environnement somatique" ; Buss 1987; Williams 2008) ou encore de l'environnement social (Wcislo 1989). Ce dernier est fortement héritable par le biais de l'hérabilité des comportements et par les processus d'apprentissages, de même que l'environnement interne est héritable par le processus biologique de reproduction des organismes. On pourra prendre pour preuve le fait que même si cela n'est pas directement

codé dans le génome, tous les embryons de fourmis se développent au sein d'une colonie de fourmis, et sont alors exposés aux variations micro-environnementales qui y sont associées alors qu'ils ne sont jamais exposés aux types facteurs environnementaux que subissent d'autres organismes ayant par exemple un développement intra utérin. Pour toutes ces raisons, les variations de l'environnement interne ou social sont susceptibles d'avoir une origine en partie génétique ou épigénétique transmissible d'une génération à l'autre et donc d'être soumises à un processus de sélection naturelle et d'influencer les trajectoires évolutives des organismes. L'évaluation du poids relatif de ces influences constitue un des défis de la biologie évolutive.

D'autre part, une autre forme d'héritabilité des facteurs environnementaux résulte de la récurrence statistique de la variabilité environnementale (West-Eberhard 2003). En effet, en raison de la structuration spatiale et temporelle de cette variabilité et de la dispersion limitée des organismes, les individus sont statistiquement soumis aux mêmes conditions de température, de prédation, de quantité de ressources, etc. que leurs parents. Prenons l'exemple des caractéristiques environnementales auxquelles sont confrontés les individus en limite géographique de l'aire de répartition d'une espèce. Les individus dispersant au-delà de cette limite de répartition sont soumis à des conditions environnementales (p.ex. températures) qui affectent négativement leur succès reproducteur. En conséquence, la production de descendants diminue géographiquement selon un gradient perpendiculaire à la limite de répartition. Ce phénomène revient à considérer que certaines conditions environnementales statistiquement héritables sont contre-sélectionnées. L'occurrence de facteurs environnementaux favorables au succès reproducteur des phénotypes qu'ils occasionnent au-delà de l'aire de répartition de l'espèce va se traduire par une production différentielle de descendants inverse, entraînant un déplacement géographique de la limite de l'aire de répartition. Il s'agit alors de la sélection de conditions environnementales nouvelles. Ceci pouvant être valable pour tous les paramètres de la niche écologique des organismes (dans un sens très large, comprenant à la fois le mode d'exploitation des ressources, les interactions interspécifiques et les caractéristiques du milieu de vie), ne peut-on pas considérer une définition de l'évolution biologique qui prenne le penchant inverse de sa version géocentrique ? « L'évolution consiste en la modification de la niche écologique des espèces de génération en génération, sous l'effet de la sélection

des caractéristiques environnementales qui permettent, en résonance avec le patrimoine génétique des individus, la production des phénotypes les plus aptes à la survie et à la reproduction. »

Références

- AntWeb. 2014. Available from <http://www.antweb.org>.
- Auffray, J.-C., P. Alibert, S. Renaud, A. Orth, and F. Bonhomme. 1996. Fluctuating Asymmetry in *Mus musculus* Subspecific Hybridization. Pp. 275–283 in L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor, and D. E. Slice, eds. *Advances in Morphometrics*. Springer US.
- Baldwin, J. M. 1896. A New Factor in Evolution. *Am. Nat.* 30:536–553.
- Baldwin, J. M. 1902. *Development and evolution*.
- Barton, N. H., and P. D. Keightley. 2002. Understanding quantitative genetic variation. *Nat. Rev. Genet.* 3:11–21.
- Bernadou, A., and J. Heinze. 2013. Mating-Associated Changes in the Behaviour of *Leptothorax gredleri* Ant Queens. *Ethology* 119:634–643.
- Bookstein, F. L. 1997. Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Med. Image Anal.* 1:225–243.
- Breuker, C. J., V. Debat, and C. P. Klingenberg. 2006. Functional evo-devo. *Trends Ecol. Evol.* 21:488–492.
- Brian, M. V. 1973. Caste control through worker attack in the ant *Myrmica*. *Insectes Sociaux* 20:87–102.
- Brian, M. V. 1980. Social Control Over Sex and Caste in Bees Wasps and Ants. *Biol. Rev.* 55:379–415.
- Brian, M. V., and J. Hibble. 1963. 9-Oxodec-trans-2-enoic acid and *Myrmica* queen extracts tested for influence on brood in *Myrmica*. *J. Insect Physiol.* 9:25–34.
- Buss, L. W. 1987. *evolution of individuality*.
- Cairns, R. B., J.-L. Gariépy, and K. E. Hood. 1990. Development, microevolution, and social behavior. *Psychol. Rev.* 97:49–65.
- Cherix, D., D. Chautems, D. J. C. Fletcher, W. Fortelius, G. Gris, L. Keller, L. Passera, R. Rosengren, E. L. Vargo, and F. Walter. 1991. Alternative reproductive strategies in *Formica lugubris* Zett. (Hymenoptera Formicidae). *Ethol. Ecol. Evol.* 3:60–66.
- Claude, J. 2008. *Morphometrics with R*. Springer.
- Cole, B. J. 1986. The social behavior of *Leptothorax allardycei* (Hymenoptera, Formicidae): time budgets and the evolution of worker reproduction. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 18:165–173.
- Crispo, E. 2007. The Baldwin Effect and Genetic Assimilation: Revisiting Two Mechanisms of Evolutionary Change Mediated by Phenotypic Plasticity. *Evolution* 61:2469–2479.
- Cronin, A. L., M. Molet, C. Doums, T. Monnin, and C. Peeters. 2013. Recurrent Evolution of Dependent Colony Foundation Across Eusocial Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 58:37–55.

- Culhane, A. C., G. Perrière, E. C. Considine, T. G. Cotter, and D. G. Higgins. 2002. Between-group analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18:1600–1608.
- Cuvillier-Hot, V., R. Gadagkar, C. Peeters, and M. Cobb. 2002. Regulation of reproduction in a queenless ant: aggression, pheromones and reduction in conflict. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 269:1295–1300.
- Darwin, C. 1859. *On the Origin of Species*. Mundus Publishing, 2006.
- David, P., and S. Samadi. 2011. *La théorie de l'évolution : Une logique pour la biologie*. Édition : édition revue et augmentée. Flammarion, Paris.
- De Vries, H. 1998. Finding a dominance order most consistent with a linear hierarchy: a new procedure and review. *Anim. Behav.* 55:827–843.
- Debat, V., and P. David. 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol. Evol.* 16:555–561.
- Doledec, S., and D. Chessel. 1987. Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique. I: Description d'un plan d'observation complet par projection de variables. *Acta Oecologica Oecologia Gen.* 8:403–426.
- Duboule, D., and A. S. Wilkins. 1998. The evolution of 'bricolage'. *Trends Genet.* 14:54–59.
- Düssmann, O., C. Peeters, and B. Hölldobler. 1996. Morphology and reproductive behaviour of intercastes in the ponerine ant *Pachycondyla obscuricornis*. *Insectes Sociaux* 43:421–425.
- Emerson, S. B. 1984. Morphological Variation in Frog Pectoral Girdles: Testing Alternatives to a Traditional Adaptive Explanation. *Evolution* 38:376.
- Fairbairn, D. J. 1997. Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of body size in males and females. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28:659–687.
- Fisher, R. A. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection: A Complete Variorum Edition*. Oxford University Press.
- Fukunaga, K. 1990. *Introduction to Statistical Pattern Recognition*. Academic Press.
- Gehring, W. J., and Y. Hiromi. 1986. Homeotic Genes and the Homeobox. *Annu. Rev. Genet.* 20:147–173.
- Gehring, W. J., and K. Ieko. 1999. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 15:371–377.
- Gobin, B., J. Billen, and C. Peeters. 1999. Policing behaviour towards virgin egg layers in a polygynous ponerine ant. *Anim. Behav.* 58:1117–1122.
- Gobin, B., J. Heinze, M. Strätz, and F. Roces. 2003. The energetic cost of reproductive conflicts in the ant *Pachycondyla obscuricornis*. *J. Insect Physiol.* 49:747–752.
- Gomulkiewicz, R., and M. Kirkpatrick. 1992. Quantitative genetics and the evolution of reaction norms. *Evolution* 46(2):390–411.

- Gösswald, K., and K. Bier. 1957. Untersuchungen zur Kastendetermination in der Gattung *Formica* 5. Der Einfluss der Temperatur auf die Eiablage und Geschlechtsbestimmung. *Insectes Sociaux* 4:335–348.
- Gould, S. J. 2002. *The Structure of Evolutionary Theory*. Harvard University Press.
- Gould, S. J., and R. C. Lewontin. 1979. The Spandrels of San Marco and the Panglossian Paradigm: A Critique of the Adaptationist Programme. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 205:581–598.
- Heinze, J., S. P. Cover, and B. Hölldobler. 1995. Neither Worker, Nor Queen: An Ant Caste Specialized in the Production of Unfertilized Eggs. *Psyche J. Entomol.* 102:173–185.
- Heinze, J., B. Hölldobler, and C. Peeters. 1994. Conflict and cooperation in ant societies. *Naturwissenschaften* 81:489–497.
- Heinze, J., and L. Keller. 2000. Alternative reproductive strategies: a queen perspective in ants. *Trends Ecol. Evol.* 15:508–512.
- Heinze, J., and K. Tsuji. 1995. Ant reproductive strategies. *Res. Popul. Ecol.* 37:135–149.
- Hölldobler, B. 1990. *The Ants*. Harvard University Press.
- Hölldobler, B., and S. H. Bartz. 1985. Sociobiology of reproduction in ants.
- Hölldobler, B., and E. O. Wilson. 1990. *The Ants*. Harvard University Press. Mass, Cambridge.
- Huxley, J. S. 1932. Problems of relative growth.
- Jacob, F. 1977. Evolution and Tinkering. *Science* 196:1161–1166.
- Johansen, W. 1909. *Elemente der exakten Erblchkeitslehre*. Jena: Fischer.
- Klingenberg, C. P. 2008. Morphological Integration and Developmental Modularity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39:115–132.
- Klingenberg, C. P. 1996. Multivariate Allometry. Pp. 23–49 in L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor, and D. E. Slice, eds. *Advances in Morphometrics*. Springer US.
- Klingenberg, C. P., M. Barluenga, and A. Meyer. 2002. Shape Analysis of Symmetric Structures: Quantifying Variation Among Individuals and Asymmetry. *Evolution* 56:1909–1920.
- Klingenberg, C. P., G. S. McIntyre, and S. D. Zaklan. 1998. Left–right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 265:1255–1259.
- Lahti, D. C., N. A. Johnson, B. C. Ajie, S. P. Otto, A. P. Hendry, D. T. Blumstein, R. G. Coss, K. Donohue, and S. A. Foster. 2009. Relaxed selection in the wild. *Trends Ecol. Evol.* 24:487–496.
- Land, M. F., and R. D. Fernald. 1992. The Evolution of Eyes. *Annu. Rev. Neurosci.* 15:1–29.
- Lehner, P. N. 1998. *Handbook of ethological methods*. Cambridge University Press.

- Lewis, E. B. 1963. Genes and Developmental Pathways. *Am. Zool.* 3:33–56.
- Londe, S., T. Monnin, R. Cornette, V. Debat, B. L. Fisher, and M. Molet. submitted. Plasticity and modularity allow for the production of novel mosaic phenotypes in ants. In process.
- Michener, C. D. 1974. *The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study*. Harvard University Press.
- Moczek, A. P. 2011. Evolutionary biology: The origins of novelty. *Nature* 473:34–35.
- Moczek, A. P. 2008. On the origins of novelty in development and evolution. *BioEssays* 30:432–447.
- Molet, M., M. V. Baalen, and T. Monnin. 2005. Dominance hierarchies reduce the number of hopeful reproductives in polygynous queenless ants. *Insectes Sociaux* 52:247–256.
- Molet, M., B. L. Fisher, F. Ito, and C. Peeters. 2009. Shift from independent to dependent colony foundation and evolution of “multi-purpose” ergatoid queens in *Myrmium* ants (subfamily Amblyoponinae). *Biol. J. Linn. Soc.* 98:198–207.
- Molet, M., V. Maicher, and C. Peeters. 2014. Bigger Helpers in the Ant *Cataglyphis bombycina*: Increased Worker Polymorphism or Novel Soldier Caste? *PLoS ONE* 9:e84929.
- Molet, M., C. Peeters, and B. L. Fisher. 2007a. Winged queens replaced by reproductives smaller than workers in *Myrmium* ants. *Naturwissenschaften* 94:280–287.
- Molet, M., C. Peeters, I. Follin, and B. L. Fisher. 2007b. Reproductive Caste Performs Intranidal Tasks Instead of Workers in the Ant *Myrmium oberthueri*. *Ethology* 113:721–729.
- Molet, M., D. E. Wheeler, and C. Peeters. 2012. Evolution of Novel Mosaic Castes in Ants: Modularity, Phenotypic Plasticity, and Colonial Buffering. *Am. Nat.* 180:328–341.
- Møller, A. P., and J. P. Swaddle. 1997. *Asymmetry, Developmental Stability and Evolution*. Oxford University Press.
- 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? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 46:413–422.
- Morata, G., and A. Garcia-Bellido. 1976. Developmental analysis of some mutants of the bithorax system of *Drosophila*. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* 179:125–143.
- Morata, G., and P. A. Lawrence. 1979. Development of the eye-antenna imaginal disc of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 70:355–371.
- Murakami, T., K. Ohkawara, and S. Higashi. 2002. Morphology and Developmental Plasticity of Reproductive Females in *Myrmecina nipponica* (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95:577–582.
- Nijhout, H. F. 2003. Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evol. Dev.* 5:9–18.

- Nijhout, H. F., and Y. Suzuki. 2008. Environment and Genetic Accommodation. *Biol. Theory* 3:204–212.
- Ohno, S. 1970. *Evolution by gene duplication*. xv + 160 pp.
- Okada, Y., L. Plateaux, and C. Peeters. 2013. Morphological variability of intercastes in the ant *Temnothorax nylanderi*: pattern of trait expression and modularity. *Insectes Sociaux* 60:319–328.
- Orr, H. A. 2000. Adaptation and the Cost of Complexity. *Evolution* 54:13–20.
- Oster, G. F., and E. O. Wilson. 1978. *Caste and Ecology in the Social Insects*. Princeton University Press.
- Peeters, C. 1991a. The occurrence of sexual reproduction among ant workers. *Biol. J. Linn. Soc.* 44:141–152.
- Peeters, C., and B. Hölldobler. 1995. Reproductive cooperation between queens and their mated workers: the complex life history of an ant with a valuable nest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:10977–10979.
- Peeters, C., and F. Ito. 2001. Colony Dispersal and the Evolution of Queen Morphology in Social Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 46:601–630.
- Peeters, C., and M. Molet. 2010. Chapter 9: colonial reproduction and life histories. *in* *Ant ecology*. Oxford University Press.
- Peeters, C. P. 1991b. Ergatoid queens and intercastes in ants: Two distinct adult forms which look morphologically intermediate between workers and winged queens. *Insectes Sociaux* 38:1–15.
- Penick, C. A., and J. Liebig. 2012. Regulation of queen development through worker aggression in a predatory ant. *Behav. Ecol.* 23:992–998.
- Pfennig, D. W., M. A. Wund, E. C. Snell-Rood, T. Cruickshank, C. D. Schlichting, and A. P. Moczek. 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 25:459–467.
- Pigliucci, M., C. J. Murren, and C. D. Schlichting. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J. Exp. Biol.* 209:2362–2367.
- Plateaux, L. 1970. Sur le polymorphisme social de la fourmi *Leptothorax nylanderi* (Förster). I. Morphologie et biologie comparée des castes. *Ann. Sci. nat. Zool. Biol. Anita.*
- Powell, S. 2008. Ecological specialization and the evolution of a specialized caste in *Cephalotes* ants. *Funct. Ecol.* 22:902–911.
- Price, T. D., A. Qvarnstrom, and D. E. Irwin. 2003. The Role of Phenotypic Plasticity in Driving Genetic Evolution. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270:1433–1440.
- Prud'homme, B., C. Minervino, M. Hocine, J. D. Cande, A. Aouane, H. D. Dufour, V. A. Kassner, and N. Gompel. 2011. Body plan innovation in treehoppers through the evolution of an extra wing-like appendage. *Nature* 473:83–86.

- Raff, R. 1996. *The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form*. University Of Chicago Press.
- Rohlf, J. 2009. tpsDig2.
- Sangster, T. A., S. Lindquist, and C. Queitsch. 2004. Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance. *BioEssays* 26:348–362.
- Schlichting, C. D. 2004. The role of phenotypic plasticity in diversification. Pp. 191–200 *in* Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches.
- Schlichting, C., and M. Pigliucci. 1998. *Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective*. Sinauer.
- Schmalhausen, I. 1949. *Factors of evolution: the theory of stabilizing selection*. Blakiston, Oxford, England.
- Shannon, C. E. 2001. A Mathematical Theory of Communication. *SIGMOBILE Mob Comput Commun Rev* 5:3–55.
- Shubin, N., C. Tabin, and S. Carroll. 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457:818–823.
- Smith, D. R., B. J. Crespi, and F. L. Bookstein. 1997. Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *J. Evol. Biol.* 10:551–574.
- Stearns, S. C. 1989. The Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity. *BioScience* 39:436–445.
- Sultan, S. E. 1992. Phenotypic plasticity and the Neo-Darwinian legacy. *Evol Trends Pl* 6(2):61–71.
- Sultan, S. E. 2003. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evol. Dev.* 5:25–33.
- Sultan, S. E., and F. A. Bazzaz. 1993. Phenotypic Plasticity in *Polygonum persicaria*. I. Diversity and Uniformity in Genotypic Norms of Reaction to Light. *Evolution* 47:1009.
- Suzuki, Y., and H. F. Nijhout. 2006. Evolution of a Polyphenism by Genetic Accommodation. *Science* 311:650–652.
- Suzuki, Y., and H. F. Nijhout. 2008. Genetic basis of adaptive evolution of a polyphenism by genetic accommodation. *J. Evol. Biol.* 21:57–66.
- Taylor, J. S., and J. Raes. 2004. Duplication and divergence: The Evolution of New Genes and Old Ideas. *Annu. Rev. Genet.* 38:615–643.
- Urbani, C. B. 1998. The number of castes in ants, where major is smaller than minor and queens wear the shield of the soldiers. *Insectes Sociaux* 45:315–333.
- Urbani, C. B., and L. Passera. 1996. Origin of Ant Soldiers. *Nature* 383:223–223.

- Van Dyken, J. D. V., and M. J. Wade. 2010. The Genetic Signature of Conditional Expression. *Genetics* 184:557–570.
- Van Kleunen, M., and M. Fischer. 2005. Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytol.* 166:49–60.
- Vander Meer, R. K., and L. E. Alonso. 1998. Pheromone communication in social insects. Westview Press. Westview Press, Oxford.
- Vargo, E. L., and D. J. C. Fletcher. 1986. Evidence of pheromonal queen control over the production of male and female sexuals in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *J. Comp. Physiol. A* 159:741–749.
- Waddington, C. H. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150(3811):563–565.
- Waddington, C. H. 1953. Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution* 7:118.
- Wagner, G. P. 1995a. Adaptation and the modular design of organisms. Pp. 315–328 in F. Morán, A. Moreno, J. J. Merelo, and P. Chacón, eds. *Advances in Artificial Life*. Springer Berlin Heidelberg.
- Wagner, G. P. 1995b. The biological role of homologues: A building block hypothesis. *Neues Jahrb. Geol. Palaontologie-Abh.* 195(1):279–288.
- Ward, P. S. 1997. Ant soldiers are not modified queens. *Nature* 385:494–495.
- Wcislo, W. T. 1989. Behavioral environments and evolutionary change. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 137–169.
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press.
- West-Eberhard, M. J. 2005a. Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:6543–6549.
- West-Eberhard, M. J. 2005b. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 304B:610–618.
- Westneat, D., and C. W. Fox. 2010. *Evolutionary Behavioral Ecology*. Oxford University Press.
- Wheeler, D. E. 1986. Developmental and Physiological Determinants of Caste in Social Hymenoptera: Evolutionary Implications. *Am. Nat.* 128:13–34.
- Wheeler, D. E. 1991. The developmental basis of worker caste polymorphism in ants. *Am. Nat.* 138:1218–1238.
- Whitcomb, W. H., A. Bhatkar, and J. C. Nickerson. 1973. Predators of *Solenopsis invicta* Queens Prior to Successful Colony Establishment. *Environ. Entomol.* 2:1101–1103.
- Whitman, D., and A. Agrawal. 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important. Pp. 1–63 in *Phenotypic plasticity of insects*.

- Williams, G. C. 2008. *Adaptation and Natural Selection: A Critique of Some Current Evolutionary Thought*. Princeton University Press.
- Wilson, E. O. 1987. Causes of Ecological Success: The Case of the Ants. *J. Anim. Ecol.* 56:1.
- Wilson, E. O. 1990. Success and dominance in ecosystems: the case of the social insects. Ecology Institute.
- Wilson, E. O. 1971. *The insect societies*. 548 pp.
- Wilson, E. O. 1974. The Soldier of the Ant *Camponotus (Colobopsis) Fraxinicola* as a Trophic Caste. *Psyche J. Entomol.* 81:182–188.
- Windig, J. J. 1994. Reaction norms and the genetic basis of phenotypic plasticity in the wing pattern of the butterfly *Bicyclus anynana*. *J. Evol. Biol.* 7:665–695.
- Woltereck, R. 1909. Weitere experimentelle untersuchungen über Artänderung, speziell über das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphniden. *Z. Für Indukt. Abstamm.-Vererbungslehre* 9:146–146.
- Yang, Y., and A. Joern. 1994. Gut Size Changes in Relation to Variable food Quality and Body Size in Grasshoppers. *Funct. Ecol.* 8:36.