



Communication chimique chez un mammifère social et monogame : rôle dans la sélection sexuelle et les relations entre groupes?

Timothée Zidat

► To cite this version:

Timothée Zidat. Communication chimique chez un mammifère social et monogame : rôle dans la sélection sexuelle et les relations entre groupes?. Evolution [q-bio.PE]. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1072 . tel-02877226

HAL Id: tel-02877226

<https://theses.hal.science/tel-02877226>

Submitted on 22 Jun 2020

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.



N° d'ordre NNT : 2019LYSEI072

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 341
Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat : Biologie Évolutive

Soutenue publiquement le 20/06/2019, par :

Timothée ZIDAT

Communication chimique chez un mammifère social et monogame: rôle dans la sélection sexuelle et les relations entre groupes?

Devant le jury composé de :

Desouhant Emmanuel , Professeur des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1, LBBE, CNRS UMR 5558, Lyon	Président
Charrier Isabelle , Directrice de Recherche CNRS, Université Paris Saclay, Neuro-PSI UMR9197, Orsay	Rapporteure
Nieberding Caroline , Professeure, Université Catholique de Louvain, ELIB, Louvain-la-Neuve	Rapporteure
Covas Rita , Chercheure, Universidade do Porto, CIBIO-InBIO, Vairão	Examinatrice
Schaal Benoist , Directeur de Recherche CNRS, Université de Bourgogne, CSGA, Dijon	Examineur
Allainé Dominique , Professeur des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1, LBBE, CNRS UMR 5558, Lyon	Directeur de thèse
Comte Gilles , Professeur des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1, LEM, CNRS UMR 5557, Lyon	Co-directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier tous les membres du jury qui ont accepté de lire cette thèse avec attention et d'évaluer mon travail, en particulier Isabelle Charrier et Caroline Nieberding, rapporteuses.

Je tiens à remercier Dominique Allainé et Gilles Comte mes directeurs de thèse. Merci de m'avoir fait confiance et pour votre soutien tout au long de ce doctorat. DA, merci d'avoir été si présent et impliqué dans l'avancement de cette thèse.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont permis d'avancer à un moment donné au court de ce long fleuve « tranquille ». Merci à Guillaume Meiffren pour m'avoir appris à dompter la GCMS. Un grand merci à Anne-Béatrice Dufour et Stéphane Dray pour leurs aides précieuses en statistiques. Merci également aux membres de mon comité de pilotage, Francesco Bonadonna, Sarah Leclaire, Marianne Gabirot et Anne-Béatrice Dufour pour leurs conseils et leur soutien. Et merci à l'équipe « Évolution, Adaptation et Comportement » pour l'agréable ambiance de travail qu'elle fait régner et la disponibilité de ses membres.

Je voudrais également remercier l'ensemble des personnes qui ont participé à la collecte des données sur le terrain. Le terrain « marmotte » c'est quelque chose lorsque l'on est perdu dans notre cabane tout là-haut n'est-ce pas ? Un grand merci à Sylvia Pardonnet sans qui le terrain ne pourrait pas aussi bien fonctionner. Un grand merci également à l'ensemble des stagiaires qui sont passés dans cette cabane (Gabriela Cino, Capucine Pernelet, Juliette Becquet, Élina Doss, Aurel Jennan, Tobie Getti, Lucie Imbert, Tiffanie Kortenhoff, Mickael Baumann, Amélie Héraud et les autres). Merci également aux anciens « thésards marmottes », Célia, Pierre, Vérane, qui sont venus nous aider ponctuellement, c'était toujours un plaisir de vous voir débarquer ! ... avec du frais !

Parce que la bonne ambiance de travail est primordiale pour ne pas lâcher avant la fin, je tiens à adresser un énorme merci à tous ceux qui ont partagé mon quotidien au laboratoire. Merci à ces amis de travail qui sont devenus de réels amis au fil des années pour leur soutien sans faille, leurs rires, leurs épaules aussi parfois, ces bières partagées, ces « raclette party » et tous ces autres bons moments partagés avec vous. MERCI !

Enfin, je tenais à remercier ma famille, pour m'avoir toujours soutenue et encouragée car c'est aussi grâce à eux.

RÉSUMÉ

La communication chimique (ou olfactive) est la forme de communication la plus répandue dans le règne animal et joue un rôle essentiel dans la médiation des comportements sociaux et reproductifs. Mon travail de thèse a consisté à étudier le rôle que pouvait avoir la communication chimique chez une espèce sociale, la marmotte Alpine (*Marmota marmota*). Je me suis d'abord intéressée au rôle de l'olfaction dans un contexte de sélection sexuelle. La marmotte Alpine est une espèce à reproduction coopérative et seuls les dominants peuvent se reproduire ce qui génère une compétition intrasexuelle très forte pour l'accès à la reproduction. En analysant les sécrétions de glandes anales de 154 individus par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse, j'ai pu mettre en évidence que les sécrétions chimiques informaient sur le statut de maturité sexuelle, le statut social ainsi que sur le sexe des individus. Ces informations pourraient être impliquées dans la compétition intrasexuelle chez cette espèce. De plus, bien qu'étant socialement monogame, la marmotte Alpine cocufie parfois son partenaire social avec des mâles présentant une meilleure compatibilité génétique (apparemment et génotype au Complexe Majeur d'Histocompatibilité). En analysant les sécrétions de glandes anales de 63 marmottes sexuellement matures, j'ai pu mettre en évidence une concordance entre les distances chimiques et l'apparemment ce qui pourrait permettre aux femelles d'évaluer la compatibilité génétique des partenaires potentiels. Pour finir, la marmotte Alpine étant une espèce territoriale je me suis intéressée au rôle de l'olfaction dans les relations intergroupes. Pour cela, j'ai testé l'hypothèse du « dear enemy phenomenon » et mis en évidence que n'importe quel étranger au groupe social est considéré comme un ennemi du groupe. Pour conclure, mes résultats montrent que la communication chimique semble jouer un rôle essentiel dans les interactions sociales et reproductives chez la marmotte Alpine.

MOTS CLÉS : choix de partenaire, communication chimique, compétition intrasexuelle, espèce sociale, GCMS, indices chimiques, interactions sociales, population naturelle.

ABSTRACT

Chemical communication (or olfaction) is the most common form of communication in the animal kingdom and plays an essential role in mediating social and reproductive behaviour. During my Ph.D. thesis, I study the role of chemical communication in a social species, the Alpine marmot (*Marmota marmota*). I was first interested in the role of olfaction in sexual selection context. The Alpine marmot is a cooperative breeder and only the dominant pair access to the reproduction, generating an intense intra-sexual competition for access to reproduction. By analysing anal gland secretions of 154 individuals with gas chromatography and mass spectrometry, I found that anal gland secretions could inform on sexual maturity, social status and sex. This information may be involved in intra-sexual competition in this species. Furthermore, although being a socially monogamous species, extra-pair paternity occurs in the Alpine marmot. Females choose males with an optimal genetic compatibility (relatedness and genotype to the Major Histocompatibility Complex). By analysing anal gland secretions of 63 sexually mature marmots, I found a significant concordance between chemical distance and relatedness, allowing females to assess the genetic compatibility of the potential partners. Finally, the Alpine marmot as being a territorial species, I was interested in the role of olfaction in relations between groups. For this, I tested the "dear enemy" hypothesis and I highlighted that any stranger to the social group is considered as an enemy of the group. To conclude, my results show that the chemical communication seems to play an important role in social and reproductive interactions of the social Alpine marmot.

KEY WORDS: chemical communication, GCMS, intra-sexual competition, mate choice, olfactory cues, social interactions, social species, wild population.

TABLE DES MATIERES

Chapitre I: INTRODUCTION GENERALE	I
I. La communication animale.....	3
I.1. Indices ou signaux?	4
I.2. Modèles d'évolution des signaux	5
I.2.1. Signaux dérivés de précurseurs de l'émetteur.....	6
I.2.2. Signaux dérivés de biais sensoriels du récepteur	8
I.3. Contextes d'évolution des signaux	9
I.3.1. Les pressions liées à la sélection naturelle	9
I.3.1.1. Manger	9
I.3.1.2. ... et éviter d'être mangé	10
a) Camouflage	10
b) Signaux de dissuasion	10
c) Signaux d'alarme	11
I.3.1.3. Favoriser le népotisme.....	11
I.3.2. Les pressions liées à la sélection sexuelle	12
I.3.2.1. La compétition intrasexuelle	12
I.3.2.2. La sélection intersexuelle	13
a) La théorie de Fisher (1930): les « sexy sons »	14
b) La théorie de la complémentarité génétique (Trivers, 1972)	15
c) La théorie des « bons gènes » et le principe du handicap (Zahavi, 1975)	16
II. La communication chimique	17
II.1. Définition des signaux chimiques	18
II.1.1. Signaux chimiques interspécifiques	18
II.1.2. Signaux chimiques intraspécifiques	18
II.2. Transmission des signaux chimiques	20
II.2.1. Production des signaux chimiques	20

II.2.1.1. Sources d'odeurs intrinsèques	20
II.2.1.2. Sources d'odeurs extrinsèques	21
a) Composés chimiques d'origine végétale	21
b) Composés chimiques d'origine bactérienne	21
II.2.2. Dissémination des signaux chimiques : l'exemple du marquage olfactif	22
II.2.2.1. Marquage olfactif passif	22
II.2.2.2. Marquage olfactif actif	22
II.2.3. Chémoréception des signaux chimiques	23
II.3. Les méthodes d'étude de la communication chimique	23
II.4. La communication chimique dans un contexte de reproduction	24
II.4.1. Trouver un partenaire.....	24
II.4.2. Communication chimique et compétition intrasexuelle.....	25
II.4.3. Communication chimique et sélection intersexuelle.....	26
II.4.3.1. Communication chimique et bénéfices directs.....	26
II.4.3.2. Communication chimique et bénéfices indirects.....	27
II.5. Signaux chimiques et interactions sociales	29
III.5.1. Reconnaissance mère-enfant.....	29
II.5.2. Reconnaissance des apparentés	30
II.5.3. Odeur de famille/groupe/clan.....	31
II.5.4. Marquage et défense du territoire.....	32
II.5.5. Reconnaissance individuelle	32
III. La communication chimique chez les espèces sociales.....	33
III.1. Définition de la socialité	33
III.2. Nécessité d'une communication complexe	34
III.3. L'exemple de la Marmotte alpine (<i>Marmota marmota</i>).....	35
III.3.1. Généralités : socialité et communication chimique	35
III.3.2. Une espèce sociale et monogame	36
III.3.3. Une espèce territoriale.....	37

IV. Objectifs de la thèse	37
BIBLIOGRAPHIE.....	40

Chapitre 2: MATERIEL & METHODES	57
---------------------------------------	----

PARTIE I: Modèle d'étude: la marmotte Alpine (<i>Marmota marmota</i>).....	59
--	----

I. Le genre <i>Marmota</i> (Ordre: Rodentia, Famille: Sciuridae)	61
--	----

II. La marmotte Alpine (<i>Marmota marmota</i> ; Linné 1758)	63
---	----

II.1. Généralités sur la marmotte Alpine	63
--	----

II.1.1. Répartition en France et en Europe	63
--	----

II.1.2. Régime alimentaire.....	64
---------------------------------	----

II.1.3. Morphologie.....	64
--------------------------	----

II.2. Organisation sociale	65
----------------------------------	----

II.2.1. Organisation en groupes familiaux.....	65
--	----

II.2.2. Structure sociale.....	65
--------------------------------	----

II.2.3. Une espèce à reproduction coopérative	66
---	----

II.3. Cycle de vie	67
--------------------------	----

II.3.1. Cycle biologique annuel	67
---------------------------------------	----

II.3.2. L'hibernation et la thermorégulation sociale	69
--	----

II.3.3. La reproduction	71
-------------------------------	----

II.4. Communication	72
---------------------------	----

II.4.1. Communication visuelle	72
--------------------------------------	----

II.4.2. Communication acoustique	73
--	----

II.4.3. Communication chimique	73
--------------------------------------	----

PARTIE 2 : Site d'étude et suivi de la population.....	75
I. La réserve naturelle de la Grande Sassièrè.....	77
II. Les territoires suivis	78
III. Capture des marmottes	79
IV. Manipulation des marmottes	80
V. Observations comportementales	81

PARTIE 3 : Collecte des sécrétions odorantes et analyse en chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GCMS)	83
I. Prélèvement et préservation des échantillons.....	85
II. Préparation des échantillons.....	87
II.1. Extraction au solvant.....	87
II.2 Standard interne.....	88
III. Analyse en GCMS.....	89
III.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	89
III.2. Spectrométrie de masse	91
III.3. Traitement des données de GCMS	93
III.3.1. Etapes de prétraitement	93
III.3.2. Identification des composés.....	94
BIBLIOGRAPHIE.....	96

Chapitre 3 : COMMUNICATION CHIMIQUE ET SELECTION SEXUELLE.....	101
--	-----

ARTICLE 1: Anal scent gland secretions inform on sexual maturity, sex and social status in the alpine marmot, <i>marmota marmota</i> (rodentia: sciuridae): a role in intrasexual competition in cooperative breeders?	103
ABSTRACT	105
INTRODUCTION.....	106
MATERIAL AND METHODS	109

Ethical note.....	II0
Collection of scent samples	II0
Gas chromatography–mass spectrometry analysis	III
Identification of compounds	III
Chemical analyses.....	II2
Data acquisition and pre-treatment	II2
Statistical analyses.....	II2
RESULTS	II5
Scent of sexual maturity status.....	II5
Scent informs on sex and social status in adult individuals	II7
DISCUSSION	I20
Scent of sexual maturation	I20
Sex effect	I2I
Social status effect	I22
Conclusion.....	I24
REFERENCES.....	I25
 ARTICLE 2: Odours as indicators of genetic compatibility in Alpine marmot (<i>Marmota marmota</i>)?	 I33
ABSTRACT	I35
INTRODUCTION.....	I37
MATERIAL AND METHODS	I4I
Study species and sampling	I4I
Chemical analyses and data processing	I42
Gas chromatography–mass spectrometry analysis.....	I42
Chemical analyses.....	I43
Genetic analyses.....	I43
Microsatellite & MHC genotyping	I43

Estimates of the neutral genetic distance	144
Estimate of genetic distance at a specific locus.....	144
Statistical analyses	145
RESULTS	146
DISCUSSION	148
Chemical composition and relatedness	148
Chemical composition and MHC class II protein distance	149
Conclusion	151
REFERENCES.....	152

Chapitre 4 : COMMUNICATION CHIMIQUE ET RELATION ENTRE GROUPES . 161

ARTICLE 3: Neighborhood bully: no conspecific intruder is welcome in Alpine marmot's families.	163
ABSTRACT	165
INTRODUCTION.....	167
MATERIAL AND METHODS	173
Field methods.....	173
Behavioural experiment	173
Experimental set-up	173
Orbital gland scent collection	174
General procedure	175
Dear enemy test.....	175
Social status-specific test	176
Measures of response	176
Statistical analyses.....	177
Chemical characterization of orbital gland secretion.....	178
Orbital gland scent collection	178

GC-MS analysis	178
Chromatographic data processing.....	179
Statistical analyses.....	179
Ethical Note.....	180
RESULTS	182
Behavioural experiment	182
Dear enemy test.....	182
Subordinate vs dominant test	184
Social status impacts on scent profiles	184
DISCUSSION	186
No dear enemy phenomenon in the Alpine marmot: neighbours, strangers, same fight	186
Social status as a confounding factor?	187
Discrimination of intruders	188
The whole social-group is threatened by any intrusion.....	189
Conclusion	190
REFERENCES.....	191

Chapitre 5 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	199
I. Discussion des résultats et perspectives.....	201
I.1. Odeurs et caractéristiques individuelles	202
I.1.1. Signatures chimiques du sexe et de la maturité sexuelle	202
I.1.2. Signature chimique du statut social.....	202
I.1.3. Une multi-source d'odeurs pour des contextes différents ?.....	203
I.2. Odeurs et groupe social.....	206
I.2.1. Signature chimique du génotype	206
I.2.2. Une reconnaissance des familiers ?.....	206
I.2.3. Des odeurs sociales d'origine bactérienne?	208

I.3. Odeurs et Complexe Majeur d'Histocompatibilité	209
I.3.1. Signature chimique du génotype au CMH de classe II.....	209
I.3.2. Quel rôle du microbiote ?.....	210
I.3.2. Micro-extraction sur phase solide (SPME) : une technique plus appropriée ?	211
II. Changement climatique et communication chimique chez la marmotte Alpine : quelle évolution future ?	213
II.1. Une restructuration des groupes sociaux chez la marmotte Alpine.....	213
II.2. La vie sociale va de pair avec la communication.....	215
II.2.1. L'hypothèse de la complexité sociale pour la communication.....	215
II.2.2. Le cas des Sciuridés.....	216
II.2.2.1. Rôles socio-démographiques et complexité des cris d'alarme	216
II.2.2.2. Taille de groupe et signature individuelle des cris d'alarme.....	217
II.3. Quels attendus chez la marmotte Alpine ?	217
III. Quid des autres canaux de communication ?	218
BIBLIOGRAPHIE.....	220

TABLE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Schéma du modèle d'évolution des signaux par des précurseurs de l'émetteur.	7
Figure 2 : Schéma du modèle d'évolution des signaux par un biais sensoriel du receveur..	8
Figure 3 : Exemples de camouflage.	10
Figure 4 : Exemples de signaux aposématiques.	11
Figure 5 : Exemples d'armements.	12
Figure 6 : La queue du paon bleu (<i>Pavo cristatus</i>) comme exemple de caractère secondaire extravagant sélectionné par le choix femelle.	13
Figure 7 : Les odeurs émises par les souris mâles sont attractives pour les femelles car elles sont représentatives de la qualité des mâles. Ces odeurs agissent donc, d'une certaine manière, comme la queue d'un paon bleu pour attirer les femelles.	28

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

Figure 8 : Carte montrant la répartition actuelle des 15 espèces du genre <i>Marmota</i> , toutes restreintes à l'hémisphère Nord.	61
Figure 9 : Phylogénie du genre <i>Marmota</i>	62
Figure 10 : Distribution actuelle de la marmotte Alpine.	63
Figure 11 : Photographie d'une marmotte adulte.	64
Figure 12 : Cycle de vie (A) et cycle de vie annuel (B) de la marmotte Alpine.	68
Figure 13 : Profil de température corporelle (en noire) et d'activité (en gris) d'un mâle adulte.	69
Figure 14 : Survie des marmottons en hiver en fonction du nombre d'auxiliaires présents dans le groupe familial pendant l'hibernation.	70
Figure 15 : Résidus du nombre d'EPY présents dans une portée en fonction de l'apparentement (A) et en fonction de la dissimilarité au CMH de classe II (B) entre le mâle dominant et la femelle dominante du groupe familial	72
Figure 16 : Vue à 360° du site d'étude à la fin du printemps.	77
Figure 17 : Cartographie des territoires des groupes familiaux étudiés en 2016.	78
Figure 18 : Capture d'une marmotte avec une cage à deux portes appâtée avec du pissenlit.	79
Figure 19 : Photographie d'une marmotte Alpine femelle (barrette métallique à sa droite) dominante (barrette en plastique à l'oreille opposée) appartenant au territoire « etalus » (barrette en plastique de couleur rose).	80
Figure 20 : Photographie des glandes anales d'une marmotte Alpine après la manipulation.	85
Figure 21 : Chromatogramme d'un échantillon de sécrétion de glande anale.	89

Figure 22 : Portion d'un chromatogramme d'un échantillon de sécrétion de glande anale. Le composé sélectionné est le pentadecanal que l'on peut identifier grâce à son spectre de masse...92

CHAPITRE 3 : COMMUNICATION CHIMIQUE ET SELECTION SEXUELLE

ARTICLE 1:

Figure 23 : Box-plot of the score on the axis of the linear discriminant analysis (LDA) separating immature (light grey circles) from sexually mature individuals (dark grey circles).116

Figure 24 : First factorial map of the linear discriminant analysis (LDA) separating adult individuals according to sex and social status.....118

Figure 25 : Graphical representation of the cosines between the 19 compounds and the first two axes of the linear discriminant analysis separating adult individuals according to sex and social status.119

ARTICLE 2:

Figure 26 : Concordance between chemical distance (blue crosses) and neutral genetic distance based on Queller & Goodnight relatedness (orange crosses). 147

CHAPITRE 4 : COMMUNICATION CHIMIQUE ET RELATION ENTRE GROUPES

ARTICLE 3:

Figure 27 : The two-way choice experimental set-up (a) and a dominant male with a light green plastic tag on the right ear (indicating its social status and sex) involved in a trial (b)..... 174

Figure 28 : Time spent smelling (a), time spent marking (b) and number of marks (c) by male and female dominant Alpine marmots for the three dear enemy experimental modalities ("stranger vs control", "neighbour vs control" and "stranger vs neighbour"). 183

Figure 29 : Time spent smelling (a), time spent marking (b) and number of marks (c) in male and female dominant Alpine marmots for the "subordinate vs dominant" experimental modality..184

Figure 30 : Score on the 1st axis of the linear discriminant analysis based on the 11 chemical compounds contributing the most to secretions discrimination (see Material and Methods for details on identification of these compounds) for dominant and subordinate individuals.....185

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Figure 31 : Premier plan factoriel de l'analyse discriminante linéaire (LDA) séparant les individus adultes en fonction de leur sexe et de leur statut social à partir des sécrétions des glandes jugales. Sexe: les mâles sont représentés par des triangles et les femelles par des cercles. 205

TABLE DES TABLEAUX

CHAPITRE 3 : COMMUNICATION CHIMIQUE ET SELECTION SEXUELLE

ARTICLE 1:

Table 1: Number of animals sampled according to sexual maturity status, social status, and sex.
..... 109

Table 2 : Chemical compounds retained in the linear discriminant analysis to separate individuals according to sexual maturity status..... 114

ARTICLE 1:

Table 3 : Procrustean co-inertia analysis results for concordance test between the four genetic distance matrices realised two by two..... 146

CHAPITRE 4 : COMMUNICATION CHIMIQUE ET RELATION ENTRE GROUPES

ARTICLE 3:

Table 4 : Empirical studies investigating the dear enemy phenomenon using scents in mammals with different sociality levels and testing for additional discrimination and chemical signature of the scents. 170

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 :

Zidat T, Dell’Ariccia G, Gabirot M, Sourrouille P, Buatois B, Celerier A, Bonadonna F, Crochet PA. 2017. Reproductive isolation maintains distinct genotypes, phenotypes and chemical signatures in mixed colonies of the two European *Calonectris* shearwaters (Procellariiformes: Procellariidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **181**: 711–726.

ANNEXE 2 :

Zidat T, Dufour AB, Meiffren G, Gabirot M, Comte G, Allainé D. 2018. Anal scent gland secretions inform on sexual maturity, sex and social status in the Alpine marmot, *Marmota marmota* (Rodentia: Sciuridae): a role in intrasexual competition in cooperative breeders? *Biological Journal of the Linnean Society* **125**: 229–239.

ANNEXE 3 :

Test de la discrimination entre un individu familial vs un individu non-familier étranger

Chapitre 1

INTRODUCTION GENERALE

I. La communication animale

Les preuves que les animaux communiquent entre eux sont partout autour de nous, et le premier exemple qui nous vient généralement en tête est le chant des oiseaux. Pour communiquer, les animaux utilisent un large panel de canaux de communication dont les principaux étudiés sont les communications acoustiques, visuelles et olfactives (Bradbury & Vehrencamp, 2011). La communication joue un rôle essentiel dans la vie des animaux et est une réelle clé de voûte dans l'étude et la compréhension de leurs comportements (McGregor & Peake, 2000; Danchin, Giraldeau, & Cézilly, 2005). En effet, la communication est au cœur de nombreux processus essentiels à la survie et à la reproduction, comme par exemple la recherche de nourriture, le choix de partenaire, ou encore les interactions sociales (e.g. Johansson & Jones, 2007; Mason & Parker, 2010; Bradbury & Vehrencamp, 2011). Par conséquent, l'étude de la communication fournit de nouvelles informations sur les processus de sélection naturelle et de sélection sexuelle.

Dans la plupart des situations, la communication peut se définir comme un transfert d'information d'un organisme émetteur, à un ou plusieurs organismes receveurs par le biais de « signaux » (Shannon & Weaver, 1949; Bradbury & Vehrencamp, 2011). Ce transfert d'information implique trois processus biologiques : 1) la production du signal par l'émetteur, 2) sa perception par le receveur, c'est-à-dire comment est perçu et traité le signal, et 3) la réponse du receveur qui est souvent comportementale, bien qu'elle puisse également être physiologique. Cette définition de la **communication au sens large** inclut donc un échange d'information intentionnel ou non, entre individus d'une même espèce ou d'espèces différentes, mais aussi la collecte d'information sur l'environnement alentour par le biais de « signaux » (Bradbury & Vehrencamp, 2011).

Bien que l'utilisation du terme « signal » soit très débattue par les biologistes, tous semblent néanmoins s'accorder sur le fait qu'il faille faire la distinction entre « signal » et « indice » (« *cue* » en anglais) (Maynard Smith & Harper, 2003; Dall et al., 2005; Scott-Phillips, 2008; Rendall, Owren, & Ryan, 2009; Bradbury & Vehrencamp, 2011).

I.1. Indices ou signaux?

De manière générale, les **indices** sont produits par les animaux sans que cela soit intentionnel (Maynard Smith & Harper, 2003; Bradbury & Vehrencamp, 2011). Par exemple, lors du choix de partenaire, les femelles ne peuvent pas évaluer directement la condition physique des partenaires potentiels et vont alors utiliser des indices corrélés à la condition physique des mâles. C'est le cas notamment chez de nombreuses espèces d'oiseaux où les femelles préfèrent s'accoupler avec des mâles présentant des couleurs vives rouge-orangées (e.g. chez le diamant mandarin, *Taeniopygia guttata* : Burley & Coopersmith, 1987; Burley, Price, & Zann, 1992 ; le bruant jaune, *Emberiza citrinella* : Sundberg, 1995, ou encore le chardonneret jaune, *Carduelis tristis*: Johnson, Rosetta, & Burley, 1993). Les caroténoïdes sont à l'origine de ces pigments et sont connus pour être importants dans le maintien de la condition physique des animaux (e.g. Hill & Montgomerie, 1994; Hill & Farmer, 2005; Mougeot *et al.*, 2007). Ces indices visuels représentent donc un bon indicateur de l'état de santé des individus et jouent un rôle important dans le choix femelle. Par cet exemple, il est facile de comprendre qu'un indice, bien qu'émis de manière non intentionnelle par les individus émetteurs (ici les mâles), peut fournir des informations aux individus receveurs (ici les femelles) conduisant à une modification du comportement de ces derniers (dans cet exemple, la décision de se reproduire ou non avec le mâle) et à l'acquisition de bénéfices directs et/ou indirects.

Les **signaux** sont quant à eux des stimuli produits intentionnellement par un individu émetteur et utilisés par un ou plusieurs individus receveurs (Maynard Smith & Harper, 2003; Bradbury & Vehrencamp, 2011). Comme les indices, les signaux sont corrélés à des informations d'intérêt, soit sur l'émetteur lui-même soit sur l'environnement. Cependant, à l'inverse des indices, les signaux modifient spécifiquement le comportement des receveurs (Maynard Smith & Harper, 2003). Par exemple, de nombreux animaux émettent des signaux d'alarme lorsqu'ils détectent un prédateur potentiel afin d'avertir leurs congénères. C'est le cas notamment chez la mésange à tête noire (*Poecile atricapilla*) qui émet des cris d'alarme qui varient en fonction de la taille du prédateur pour avertir ses congénères du danger afin qu'ils puissent voir une réponse comportementale appropriée et fuir (Templeton, 2005).

Indices et signaux sont donc des traits qui ont évolué parce qu'ils modifient le comportement des individus receveurs. Cependant, ils diffèrent en deux points (Maynard Smith & Harper, 2003). Premièrement, les indices sont « ouverts » (i.e. permanents), tandis que les signaux sont volontairement émis par les individus émetteurs et peuvent donc être « ouverts » ou « fermés » en fonction du contexte. Deuxièmement, une fois qu'un indice a été produit, il ne coûte rien de plus pour être exprimé, alors que l'émission de signaux peut entraîner des coûts énergétiques supplémentaires liés justement à l'intentionnalité d'émission et à la production du signal. Par exemple, il a été mis en évidence chez les cicadelles (*Aphrodes makarovi*), que la production de son par vibration est 12.4 fois plus coûteuse en énergie qu'un état au repos car elle nécessite une consommation en oxygène plus importante, ce qui a un impact négatif sur la longévité des individus (Kuhelj *et al.*, 2015).

Tout en gardant à l'esprit ces notions sémantiques et ces définitions critiques (e.g. Maynard Smith & Harper, 2003; Owren, Rendall, & Ryan, 2010; Ruxton & Schaefer, 2011), je vais considérer tout au long de ma thèse qu'un indice va être corrélé à une information particulière de l'individu émetteur, et qu'un signal sera un indice qui suscite une réponse comportementale des individus receveurs. En d'autres termes, je considérerai donc qu'un indice est ce qui est juste corrélé à l'information d'intérêt, bien qu'il puisse susciter une réponse des individus receveurs, alors que j'appellerai signal tout indice dont il aura été démontré par des expériences comportementales qu'il suscite bien une réponse spécifique des individus receveurs.

1.2. Modèles d'évolution des signaux

La question de l'évolution des signaux se pose alors. Lors d'un transfert d'information chacun des partis, émetteur et receveur, subit des coûts (e.g. le coût de production du signal pour l'émetteur et le coût à répondre au signal pour le receveur), mais obtient des bénéfices grâce aux avantages fournis par l'autre parti (e.g. l'accès à la reproduction pour les mâles et une meilleure valeur sélective pour les femelles). Pour initier ce transfert d'information, l'émetteur ou le receveur a d'abord dû mettre en place des précurseurs à son éventuel rôle dans la communication pour des raisons autres que la

communication elle-même. Deux scénarios sont alors décrits (Bradbury & Vehrencamp, 2011).

1.2.1. Signaux dérivés de précurseurs de l'émetteur

Ce modèle d'évolution des signaux (**Fig.1**) nécessite un prérequis, l'association entre un indice (e.g. un chant, un comportement, une odeur) et une information d'intérêt de l'émetteur (1). Cette corrélation peut survenir lorsque l'indice est un sous-produit involontaire d'une activité réalisée dans des conditions spécifiques. C'est le cas notamment chez les fourmis des bois (*Formica rufa*) qui pulvérisent de l'acide formique sur leurs prédateurs ce qui va permettre aux autres conspécifiques d'être avertis de ce danger. Ce signal chimique est donc à la fois un produit de défense chimique et un signal d'alarme (Löfqvist, 1976; Bennett, Lloyd, & Cuthill, 1996). Il est cependant possible que la corrélation entre l'indice et l'information d'intérêt soit imparfaite, mais cela ne signifie pas nécessairement qu'il n'y ait pas d'intérêt à communiquer. Au contraire, même un léger bénéfice net pour l'émetteur et le receveur peut favoriser la poursuite de la production d'indices imparfaits à condition que le receveur puisse les percevoir (2) et y répondre (3). Si grâce à sa réponse, le receveur obtient des bénéfices (4), alors une coévolution ultérieure favorisant ce transfert d'information peut apparaître. Si l'émetteur bénéficie de la réponse du receveur (5a), une ritualisation se mettra en place afin de maximiser le transfert de l'information. Au contraire, si la réponse du receveur ne bénéficie pas à l'émetteur (5b), ce dernier aura tendance à vouloir dissocier l'indice de l'information d'intérêt. Cependant, si l'indice s'éloigne peu à peu de cette information, l'émetteur peut alors se mettre à exagérer l'indice en apportant de nouvelles informations, ou se mettre à bluffer ce qui aurait un effet négatif sur la valeur sélective¹ du receveur (6) qui devrait alors essayer d'améliorer sa capacité de discrimination de l'indice et modifier sa réponse en conséquence (7).

¹ Ce terme décrit la capacité d'un individu à transmettre ses gènes à la génération suivante, et se mesure généralement comme le nombre de descendants qu'un individu produit.

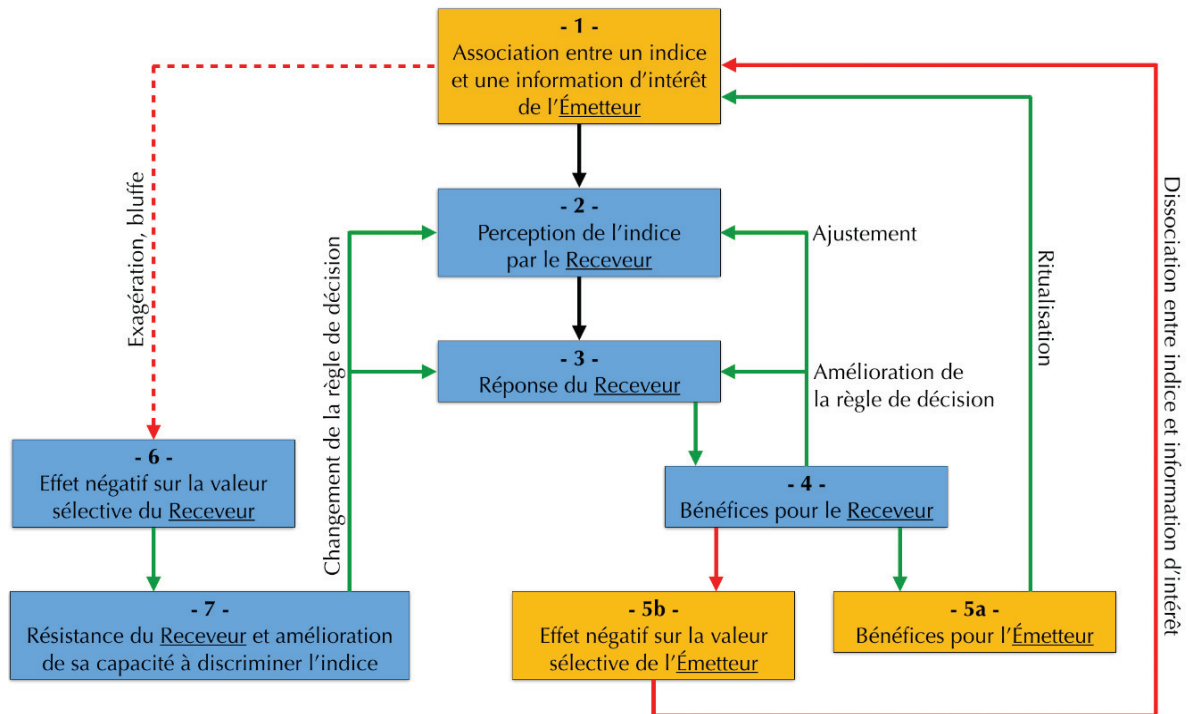


Figure 1 : Schéma du modèle d'évolution des signaux par des précurseurs de l'émetteur (adapté de Bradbury & Vehrencamp, 2011). Les boîtes bleues représentent les étapes concernant le receveur, les boîtes orange représentent les étapes concernant l'émetteur ; les flèches rouges indiquent un effet négatif sur la valeur sélective des individus ; et les flèches vertes indiquent un effet positif sur la valeur sélective des individus.

I.2.2. Signaux dérivés de biais sensoriels du récepteur

La première étape de ce modèle d'évolution des signaux (**Fig.2**) est l'évolution de biais sensoriels qui sont souvent associés à une réponse spécifique du receveur (**1**). Ces biais sensoriels du receveur ont évolué via la sélection naturelle pour détecter des indices environnementaux liés par exemple à la présence de nourriture ou de prédateurs. Les émetteurs peuvent alors développer un trait qui stimule ce biais sensoriel pour bénéficier de la réponse du receveur (**2**). Si le receveur profite également de cet échange (**3a**), un processus de ritualisation peut se mettre en place pour affiner et améliorer ce transfert d'information. En revanche, si le receveur ne bénéficie pas de cet échange (**3b**), alors le biais sensoriel peut être modifié pour atténuer cet effet négatif, ce qui peut être coûteux. L'émetteur pourra alors initier une coévolution antagoniste, et le receveur devra donc améliorer sa capacité à faire la distinction entre le trait mimétique de l'émetteur et le vrai stimulus environnemental afin d'avoir une réponse appropriée à chaque cas de figure (**4**). Ce modèle d'évolution des signaux est typiquement impliqué dans l'évolution des signaux d'attraction des partenaires sexuels (Bradbury & Vehrencamp, 2011).

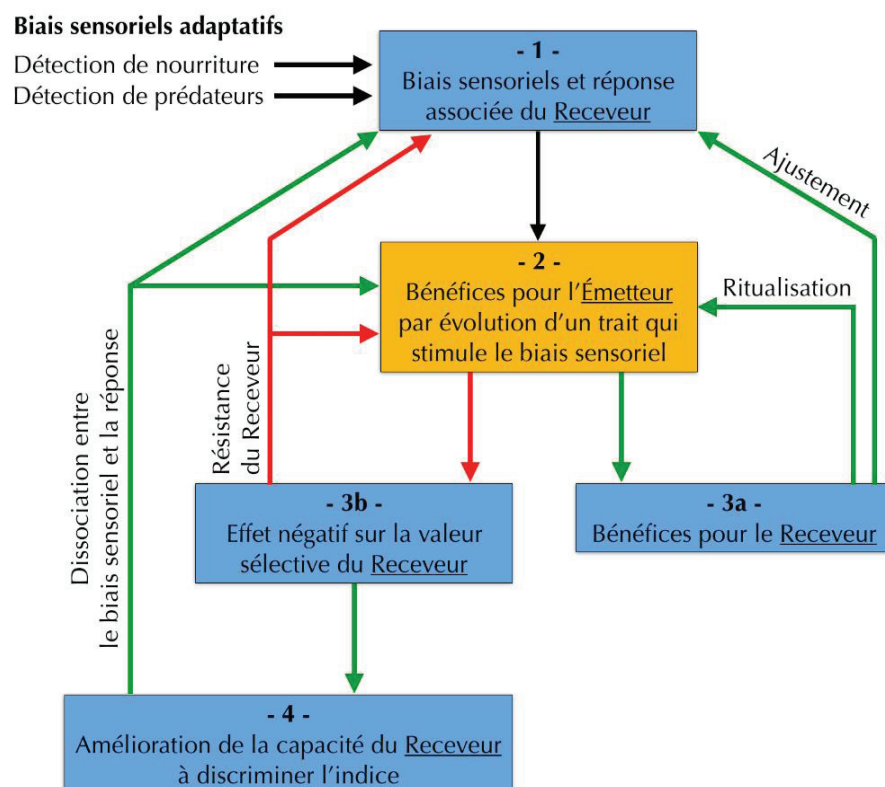


Figure 2 : Schéma du modèle d'évolution des signaux par un biais sensoriel du receveur (adapté de Bradbury & Vehrencamp, 2011). Légendes identiques à la Fig. 1.

Dans les deux scénarios il suffit que l'un des deux précurseurs apparaisse pour que l'autre parti puisse acquérir l'information d'intérêt, s'en servir et en tirer des bénéfices pour qu'une coévolution apparaisse. Cette coévolution entre l'émetteur et le receveur permettra alors un transfert d'information plus efficace. Ces deux modèles d'évolution des signaux existent dans la nature et peuvent être impliqués dans différents contextes d'évolution.

I.3. Contextes d'évolution des signaux

La plupart des animaux ont déjà investi dans des organes sensoriels plus ou moins développés leur permettant de capter et d'utiliser les signaux ou indices générés par d'autres individus. Dans la partie précédente nous avons vu les mécanismes par lesquels les signaux se mettent en place. Il convient maintenant d'identifier les pressions de sélection qui ont favorisé leur évolution. L'évolution des signaux relève aussi bien de la sélection naturelle que de la sélection sexuelle mais je ne développerai ici que les pressions favorisant la communication entre congénères.

I.3.1. Les pressions liées à la sélection naturelle

I.3.1.1. Manger ...

Trouver de la nourriture est indispensable à la survie des animaux. De nombreuses espèces utilisent des signaux de recrutement qui permettent d'indiquer à leurs congénères où se trouve la source de nourriture qu'ils viennent de trouver. Beaucoup de ces espèces varient alors la probabilité d'émission de ces signaux de recrutement en fonction de la quantité de ressource disponible (e.g. Notman & Rendall, 2005; Pollick, Gouzoules, & de Waal, 2005). Par exemple, les mésanges de Caroline (*Poecile carolinensis*) utilisent des cris d'appel pour attirer leurs congénères vers un nouveau site alimentaire en utilisant une série de notes « D », mais à mesure que le nombre d'individu arrivant sur le site augmente et donc que la ressource diminue, le nombre de notes « D » du cri d'appel diminue ce qui provoque un ralentissement du recrutement (Mahurin & Freeberg, 2009). Ces signaux de recrutement sont généralement émis lorsque la ressource est suffisamment abondante

pour plusieurs individus, et lorsque le site est dégagé et expose alors les individus aux prédateurs (dilution de l'effet de prédation) (Elgar, 1986).

I.3.1.2. ... et éviter d'être mangé

a) Camouflage

La stratégie anti-prédation la plus simple et la plus courante consiste à éviter d'être détecté par les prédateurs par camouflage (Hasson, 1994). Pour cela, de nombreuses espèces ont développé des traits particuliers (e.g. des motifs de couleur, des formes, des sons, des odeurs ou des comportements) qui diminuent leurs chances d'être détectées par les prédateurs. Le camouflage est une stratégie anti-prédation très courante chez les arthropodes (Roy, Guilbert, & Bourgoïn, 2007; Skelhorn, Rowland, & Ruxton, 2010 ; Fig.3A et 3B).

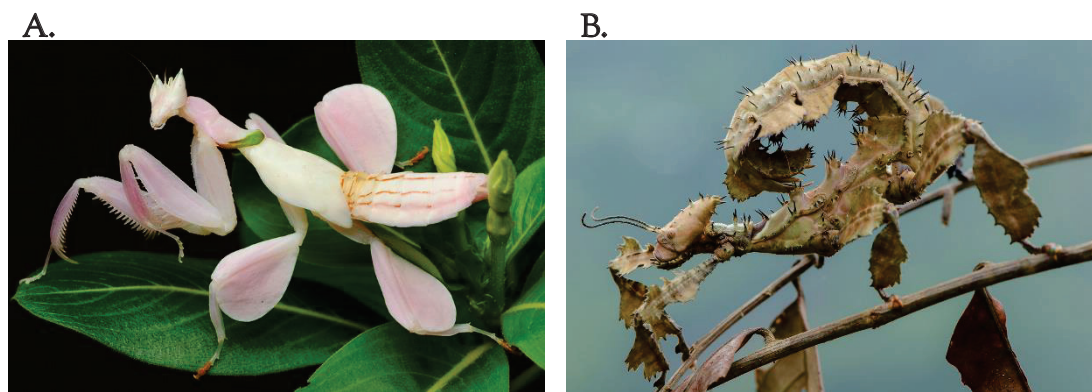


Figure 3 : Exemples de camouflage. © Chien C. Lee

A. Une mante religieuse (*Hymenopus coronatus*) se faisant passer pour une orchidée.

B. Un phasme (*Extatosoma popa*) se camouflant en brindilles et feuilles.

b) Signaux de dissuasion

Une autre stratégie anti-prédation efficace est l'utilisation de signaux dits aposématifs. Ces signaux rendent les animaux plus visibles, comme par exemple avec des couleurs vives (Fig.4A et 4B), afin d'annoncer aux prédateurs leur nocivité, que cela soit dû à des défenses chimiques ou à des défenses physiques (Greenwood, 2009).

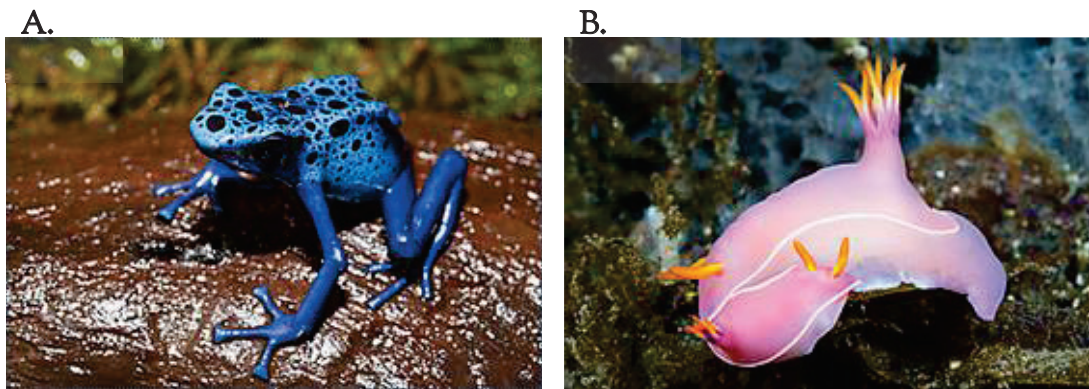


Figure 4 : Exemples de signaux aposématifs. © Reinhard Dirscherl

A. Une dendrobate bleue (*Dendrobates tinctorius* "azureus").

B. Une espèce de nudibranche (limace de mer, *Hypselodoris bullockii*).

c) Signaux d'alarme

Contrairement aux signaux de dissuasion qui sont à destination des prédateurs, les signaux d'alarme sont émis afin de prévenir les « proies » de la présence d'un prédateur (Hollén & Radford, 2009). Un exemple très connu est celui des cris d'alarme chez le suricate (*Suricata suricatta*), qui est une espèce vivant en groupes familiaux. Chez cette espèce, certains membres du groupe vont jouer le rôle de sentinelle afin de surveiller les alentours (posture de surveillance) et prévenir l'ensemble des membres du groupe de la présence d'un prédateur par le biais de cris d'alarme (Manser, 2001; Manser, Bell, & Fletcher, 2001). Les individus sentinelles émettent alors différents cris d'alarme en fonction du type de prédateur et du niveau d'urgence ce qui va permettre aux autres membres du groupe d'avoir une réponse comportementale appropriée au cri d'alarme et donc au type de danger (Manser, 2001; Manser *et al.*, 2001).

1.3.1.3. Favoriser le népotisme

La sélection naturelle a également favorisé l'évolution de signaux qui permettent de reconnaître les apparentés pour pouvoir ainsi les favoriser (népotisme, « *kin recognition* » et « *kin nepotism* » en anglais). La reconnaissance parent-enfant a alors une grande importance pour favoriser le népotisme. Les signaux de reconnaissance des apparentés peuvent être très sophistiqués et leur sophistication va dépendre de la difficulté à les reconnaître. Par exemple, chez les otaries à fourrure subantarctiques (*Arctocephalus tropicalis*), les mères laissent leur petit pendant la période de croissance pour effectuer de

longues et fréquentes sessions de nourrissage en mer. Une fois que les femelles reviennent à la colonie, elles doivent pouvoir retrouver leur petit parmi plusieurs centaines d'autres ce qui présente un risque élevé de confusion. Chez cette espèce, la reconnaissance parent-enfant se fait notamment par le biais de signaux acoustiques (Charrier, Mathevon, & Jouventin, 2002, 2003 mais voir aussi Wierucka *et al.*, 2018). Les cris d'alarme présentés précédemment dans l'exemple des suricates favorisent également le népotisme en protégeant indirectement les membres de sa famille et par conséquent ses apparentés (e.g. Sherman, 1977; Hoogland, 1983).

L'évolution des signaux relève donc de la sélection naturelle d'une part, mais également de la sélection sexuelle d'autre part, par le biais de pressions de sélection liées à la compétition intrasexuelle mais aussi à la sélection intersexuelle.

I.3.2. Les pressions liées à la sélection sexuelle

I.3.2.1. La compétition intrasexuelle

La compétition intrasexuelle pour l'accès aux femelles explique l'évolution de signaux signalant la compétitivité des mâles. En effet, les mâles de certaines espèces ont développé des armes spécialement pour la compétition intrasexuelle (Emlen, 2008). Ces signaux de capacité de combat peuvent être des structures morphologiques particulières, comme par exemple des cornes, des défenses ou encore des mandibules (Fig.5A et 5B).

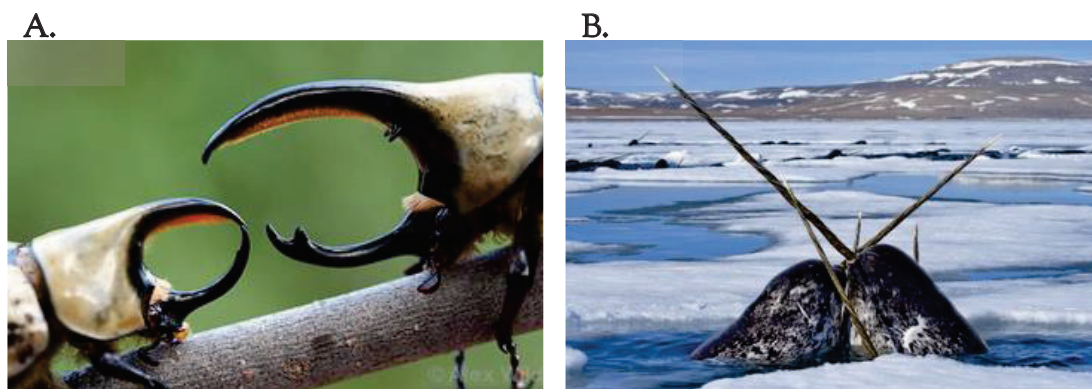


Figure 5 : Exemples d'armements. © Alex Wild (A) & © Paul Nicklen (B)

A. Deux mâles dynaste de Grant (*Dynastes granti*) prêts à combattre.

B. Des narvals (*Monodon monoceros*) entrain de combattre.

I.3.2.2. La sélection intersexuelle

L'évolution des signaux a particulièrement été étudiée dans un contexte de sélection sexuelle et plus particulièrement lors du choix femelle. En effet, la présence de caractères sexuels secondaires extravagants (e.g. la queue du paon bleu, *Pavo cristatus*, **Fig.6**), généralement coûteux en termes de valeur sélective (e.g. provoque une augmentation du risque de prédation), nécessitait une explication en parallèle de la sélection naturelle (Darwin, 1871). Si les signaux produits par un individu émetteur (i.e. les mâles) sont captés puis utilisés par un individu receveur (i.e. les femelles), et que ce transfert d'information apporte des bénéfices aux deux partis, alors une coévolution ultérieure du signal de l'émetteur et de sa perception par le receveur peut conduire à une exagération du trait (i.e. le signal). Cette exagération pourrait alors affiner et améliorer ce processus de transfert d'information (Bradbury & Vehrencamp, 2011). Différentes théories ont alors été proposées pour expliquer l'évolution de caractères secondaires extravagants ; la théorie de Fisher (Fisher, 1930), la théorie de la complémentarité génétique (Trivers, 1972), et la théorie des « bons gènes » et le principe du handicap (Zahavi, 1975).



Figure 6: La queue du paon bleu (*Pavo cristatus*) comme exemple de caractère secondaire extravagant sélectionné par le choix femelle.

© Frans Lanting

a) La théorie de Fisher (1930): les « sexy sons »

Fisher fut le premier à proposer un processus génétique pour expliquer l'évolution des préférences des femelles pour des traits exagérés et coûteux (Fisher, 1930; Pomiankowski, 1987). Le modèle de Fisher implique une préférence des femelles pour un trait porté par les mâles. Cette préférence peut être le résultat d'une mutation pour un certain trait, ou d'une exploitation d'un biais sensoriel présent chez les femelles (Arnqvist, 2006). La préférence des femelles pour un type de mâle particulier ne présente alors aucun avantage en termes de qualité du mâle choisi mais va augmenter l'attractivité de leurs fils (Kokko, Jennions, & Brooks, 2006). Par exemple, les femelles peuvent être attirées par la couleur rouge intense. Si certains mâles de la population présentent une tâche rouge sur leur corps, alors les femelles vont préférer ces mâles (biais sensoriel), sans pour autant acquérir un quelconque bénéfice sur leur valeur sélective. Dans ce cas, les femelles qui utilisent cette préférence pour sélectionner leurs partenaires produiront une descendance portant à la fois les gènes de préférence de leur mère et les gènes du trait d'intérêt de leur père (i.e. une tâche rouge dans notre exemple). Une covariance positive entre les gènes maternels et paternels se forme alors. En conséquence, ce trait pourrait devenir de plus en plus courant et de plus en plus développé au fil des générations, tandis que les mâles ne possédant pas ce trait seraient pénalisés car ils n'auraient pas accès à la reproduction. Il en résulte alors un processus d'emballement qui engendre une élaboration rapide du trait d'intérêt masculin ainsi que des changements dans le choix moyen des femelles, et va produire un trait masculin plus exagéré. Les mâles présentant ce trait extravagant augmenteront alors leur valeur sélective car leurs fils seront préférés en tant que partenaires (« *sexy sons* » en anglais, Fisher, 1930).

Le processus d'emballement de Fisher est également appelé le modèle des « *sexy sons* » car les femelles augmentent leur valeur sélective en produisant des descendants mâles qui auront un succès reproducteur plus élevé. Cependant, à mesure que le processus d'emballement se poursuit, le trait extravagant masculin risque de devenir un obstacle en raison de contraintes de développement, de coûts de production ou de risques de prédation. L'élaboration de ce trait s'arrêtera donc lorsque le coût de viabilité lié à la

sélection naturelle sera plus important que les bénéfices d'accouplement liés à la sélection sexuelle.

b) La théorie de la complémentarité génétique (Trivers, 1972)

La compatibilité génétique peut prendre plusieurs formes mais elle est le plus souvent mesurée par la non similarité des allèles entre les deux parents (Trivers, 1972; Zeh & Zeh, 1996, 1997). En effet, des parents génétiquement dissimilaires vont produire des descendants hétérozygotes qui seront de meilleure qualité pour différentes raisons. Premièrement, l'hétérozygotie globale au niveau du génome entier limite les risques liés à une éventuelle dépression de consanguinité (Puurtinen, Ketola, & Kotiaho, 2009; Hettyey *et al.*, 2010). Cependant, un choix pour un partenaire extrêmement dissimilaire pourrait aussi perturber les complexes de gènes localement adaptés et avoir pour effet une diminution de la valeur sélective des individus. Si tel est le cas, les femelles devraient préférer un partenaire présentant une similarité optimale (« *optimal outbreeding* » en anglais ; Rätti *et al.*, 1995; Bonneaud *et al.*, 2006). Deuxièmement, l'hétérozygotie peut générer une épistasie, c'est-à-dire une interaction entre deux allèles, qui pourrait avoir un effet positif sur la valeur sélective des descendants (« *nonadditive genetic benefit* » en anglais ; Irwin & Taylor, 2000; Lehmann, Keller, & Kokko, 2007; Fromhage, Kokko, & Reid, 2009; Neff & Pitcher, 2009; Puurtinen *et al.*, 2009). Troisièmement, au travers de leur choix, les femelles peuvent cibler un gène particulier. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) a été proposé comme un bon candidat à ce choix ciblé. Les gènes du CMH représentent un groupe de gènes extrêmement divers qui a été largement étudié en raison de son importance pour la réponse immunitaire adaptative et la résistance aux pathogènes chez les vertébrés (Yamazaki *et al.*, 1976; Tregenza & Wedell, 2000; Penn, 2002; Bernatchez & Landry, 2003). L'hétérozygotie au CMH confère un avantage sélectif aux individus, car ils sont capables de reconnaître un plus grand nombre d'agents pathogènes et ont donc une résistance plus élevée aux infections parasitaires (Penn, Damjanovich, & Potts, 2002). Produire des descendants hétérozygotes au CMH devrait permettre d'améliorer leur immunocompétence et leur viabilité.

Quels que soient les types d'avantages liés à l'hétérozygotie, les femelles devraient préférer les mâles possédant des allèles compatibles avec leur propre génome (Tregenza & Wedell, 2000), et bien que ce type de bénéfices génétiques soit **non héritable**, la préférence des femelles pour l'acquisition de gènes compatibles peut évoluer en tirant profit de cette sélection pour des mâles génétiquement compatibles (Zeh & Zeh, 2003; Mays & Hill, 2004; Neff & Pitcher, 2005). De nombreuses études empiriques ont maintenant prouvé que les femelles choisissent leur partenaire selon l'hypothèse de compatibilité génétique, tant chez les invertébrés que chez les vertébrés (e.g. Penn, 2002; Neff & Pitcher, 2005; Milinski, 2006; Mays *et al.*, 2008). Cependant, une des questions qui reste encore ouverte est de comprendre comment les femelles peuvent évaluer la compatibilité génétique de leurs partenaires. En d'autres termes, quels signaux sont utilisés par les femelles pour évaluer la compatibilité génétique ? Les signaux chimiques semblent être des bons candidats pour renseigner sur le profil génétique des individus.

c) La théorie des « bons gènes » et le principe du handicap (Zahavi, 1975)

Un deuxième élément de la qualité génétique est en lien avec les « bons gènes ». Le modèle des « bons gènes » commence, quant à lui, par une préférence des femelles pour certains traits masculins qui, à l'inverse du modèle de Fisher, sont **héritable**s et corrélés à leur viabilité. Le trait préféré informe donc sur la qualité du mâle. Cela peut se produire lorsque le trait dépend de la condition physique du mâle ou indique un autre aspect de sa viabilité, tel que son âge, sa taille ou son immunocompétence. Cette préférence des femelles pour ce trait leur permettra de produire des descendants de meilleure qualité et avec une meilleure probabilité de survie (« *additive genetic benefit* » en anglais ; Andersson, 1994; Andersson & Simmons, 2006; Grether, 2010). Cet avantage indirect amène donc les femelles à être de plus en plus sélectives vis-à-vis de ce trait masculin. Par exemple, chez le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), le développement des bois et la masse corporelle des mâles sont associés à des caractéristiques génétiques particulières, notamment des gènes du CMH qui jouent un rôle important dans la résistance aux pathogènes (Ditchkoff *et al.*, 2001). Nous nous attendons donc à ce que toutes les femelles d'une population montrent un choix relativement congruent pour ce même trait masculin exagéré, c'est-à-dire une sélection directionnelle pour des grands bois dans notre exemple. En effet, il a

été montré chez le chevreuil Européen (*Capreolus capreolus*) que les femelles préfèrent les mâles possédant de grands bois car c'est un signal honnête de leur qualité (Vanpé *et al.*, 2010).

Ce modèle des « bons gènes » suppose donc que les femelles puissent produire une progéniture de meilleure qualité en préférant les mâles présentant des signaux de bonne viabilité et de bonne santé qui seront héréditaires. Les femelles utilisent alors ces traits exagérés corrélés à la bonne condition physique des mâles pour faire leur choix. Cependant, pour éviter que ces signaux ne soient produits par des mâles de moins bonne qualité (i.e. des tricheurs), le trait extravagant doit représenter un handicap pour que seuls les mâles de qualité suffisante puissent se permettre d'exprimer les versions les plus coûteuses de ce trait. En effet, Amotz Zahavi énonce par sa **théorie du handicap** que pour qu'un signal soit honnête, c'est à dire reflétant la qualité de l'émetteur, il faut qu'il lui soit coûteux à produire (Zahavi, 1975). De ce fait, la malhonnêteté devrait être limitée car les trompeurs et les bluffeurs ne pourraient pas se permettre de produire de tels signaux (« *handicaps* » en anglais ; Zahavi, 1975, 1977). Ainsi, en préférant des signaux dont la production est coûteuse, les femelles peuvent obtenir des informations fiables sur la qualité des mâles. Le principe du handicap est maintenant largement accepté comme un mécanisme important pour l'évolution de signaux fiables (Pomiankowski, 1987; Grafen, 1990; Iwasa, Pomiankowski, & Nee, 1991; Johnstone, 1995).

II. La communication chimique

La majorité des études réalisées sur la communication animale s'est concentrée sur les signaux visuels et acoustiques, négligeant pendant longtemps la communication chimique, ceci probablement dû à notre propre biais sensoriel (Heymann, 2006; Coleman, 2009). Or, la communication chimique (ou olfactive) est considérée comme la forme de communication la plus ancienne et la plus répandue dans le règne animal (Albone, 1984; Brown & Macdonald, 1985; Wyatt, 2014). Les signaux chimiques présentent de nombreux avantages par rapport aux autres signaux de communication de par leur persistance dans le temps, et leur efficacité dans l'obscurité, mais également en l'absence de l'émetteur

(Eisenberg & Kleiman, 1972; Alberts, 1992). Dans la suite de cette introduction je ne me focaliserai uniquement sur les animaux terrestres.

II.1. Définition des signaux chimiques

II.1.1. Signaux chimiques interspécifiques

Plusieurs termes peuvent être employés pour parler de signaux chimiques en fonction des contextes dans lesquels ils sont utilisés (Nordlund & Lewis, 1976). Tout d'abords les signaux chimiques utilisés entre individus d'espèces différentes, appelés signaux allélochimiques (« *allelochemicals* » en anglais), regroupent trois types de substances chimiques : i) les **allomones**, qui vont être bénéfiques pour l'espèce émettrice. C'est le cas, par exemple, chez une espèce d'orchidée (*Dendrobium sinense*) qui mime la phéromone d'alarme des abeilles (*Apis cerana* et *Apis mellifera*) pour attirer les frelons (*Vespa bicolor*) et permettre ainsi sa pollinisation (Brodmann *et al.*, 2009) ; ii) les **kairomones**, qui vont être bénéfiques pour l'espèce réceptrice, permettant notamment aux prédateurs ou parasites de détecter leurs proies ou leurs hôtes à grande distance. C'est le cas, par exemple, chez les arthropodes hématophages qui repèrent leurs hôtes grâce aux substances chimiques qu'ils émettent (Takken, 1991) ; et iii) les **synomones**, qui vont être bénéfiques à la fois pour l'espèce émettrice et pour l'espèce réceptrice, ce qui est particulièrement le cas lors des processus de pollinisations.

II.1.2. Signaux chimiques intraspécifiques

Les signaux chimiques sont également utilisés lors des échanges entre individus d'une même espèce, et dans ce cas, il est important de faire la distinction entre « phéromone » et « signature de mélange » (« *signature mixture* » en anglais, Wyatt, 2010). Les **phéromones** sont des molécules qui ont évolué comme un signal entre des organismes de la même espèce et qui déclenchent une **réaction spécifique** chez les individus receveurs, comme par exemple un comportement stéréotypé qui va être commun à tous les individus. Les phéromones sont généralement une molécule particulière ou un ensemble de molécules dans des proportions relatives spécifiques (Wyatt, 2010). La première phéromone mise en évidence dans le règne animal a été le bombykol, phéromone sexuelle

émise par les femelles bombyx du mûrier (*Bombyx mori*) pour attirer les mâles, décrite par le chimiste Adolf Butenandt et son équipe en 1959 (Butenandt *et al.*, 1959). Chez les insectes, d'autres phéromones ont été découvertes, comme par exemple la phéromone d'alarme (E)-bêta-farnésène chez le puceron du cotonnier (*Aphis gossypii*, Byers, 2005), la phéromone sexuelle de la reine des abeilles qui attire les mâles et qui, associée à la phéromone de couvée émise par les larves, entraîne une inactivation continue des ovaires des ouvrières (Slessor, Winston, & Le Conte, 2005), la phéromone sexuelle des mâles chez le papillon *Bicyclus anynana* (Nieberding *et al.*, 2008), ou encore les phéromones de trace chez les insectes sociaux comme les fourmis (Jackson & Ratnieks, 2006; Jackson & Châline, 2007). Cependant, l'identification des phéromones reste difficile, en particulier chez les mammifères chez qui les odeurs sont généralement très complexes et contiennent un grand nombre de molécules, car il faut réussir à cibler la ou les quelques molécules d'intérêt parmi l'ensemble des composés chimiques émis par les espèces. Néanmoins, des phéromones ont été découvertes chez trois mammifères : le lapin de Garenne (*Oryctolagus cuniculus* ; Schaal *et al.*, 2003), la souris grise (*Mus musculus* ; Novotny *et al.*, 1985; Novotny, 2003), et l'éléphant d'Asie (*Elephas maximus* ; Rasmussen, Lazar, & Greenwood, 2003). La plus connue des trois est vraisemblablement la phéromone mammaire chez les lapines ; le 2-méthyl but-2-énal (2MB2, Schaal *et al.*, 2003). Cette phéromone, présente dans le lait maternel, va stimuler et provoquer une recherche stéréotypée de la part des nouveau-nés inexpérimentés, les guidant vers le lait de leur mère en seulement quelques secondes (Schaal *et al.*, 2003; Charra *et al.*, 2013).

Le terme « *signature mixture* », proposé par Wyatt (2010) et inspiré du « *mosaic signal* » de Johnston (2003), désigne un sous-ensemble de molécules issu de l'odeur d'un individu particulier, qui va être appris en tant que modèle de reconnaissance par les individus conspécifiques et utilisé pour reconnaître cet organisme en tant qu'individu ou membre d'un groupe social particulier. Une « *signature mixture* » peut alors être un ensemble de composés spécifiques dans des proportions relatives particulières, caractéristique par exemple d'une espèce (e.g. Zhang *et al.*, 2003; Zabaras, Richardson, & Wyllie, 2005; delBarco-Trillo *et al.*, 2011, 2012; Zidat *et al.*, 2017 : **Annexe 1**), d'un sexe (e.g. Zhang *et al.*, 2008; Cross *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2014), d'une classe d'âge (e.g. MacDonald *et al.*, 2008;

Kean, Müller, & Chadwick, 2011; Rosell et al., 2011; Linklater, Mayer, & Swaisgood, 2013), ou encore d'un individu particulier (e.g. Smith et al., 2001; Palagi, 2006; Mardon et al., 2010). C'est le cas notamment des fourmis *Formica exsecta*, qui produisent des molécules caractéristiques de l'espèce, mais chez qui chaque colonie va émettre une odeur spécifique qui va varier en termes de combinaison et de proportion de ces mêmes molécules (van Zweden & d'Ettorre, 2010). Les « *signature mixtures* » nécessitent donc un **apprentissage** de la part des conspécifiques et doivent être suffisamment variables pour permettre de faire une distinction entre individus d'une même espèce.

Pour résumer, une phéromone sera une (ou plusieurs) molécule qui va être produite, par exemple, par tous les individus mâles et entraîner un comportement stéréotypé tel que l'attraction des femelles. L'ensemble des femelles va alors être attiré par cette odeur. Tandis qu'une « *signature mixture* » sera, dans cet exemple, un ensemble de molécules produites dans des proportions spécifiques pour un mâle particulier, qu'une femelle va pouvoir apprendre et utiliser pour le reconnaître spécifiquement parmi l'ensemble des mâles possibles (Wyatt, 2010, 2014).

II.2. Transmission des signaux chimiques

II.2.1. Production des signaux chimiques

II.2.1.1. Sources d'odeurs intrinsèques

Chez les vertébrés et les invertébrés, les signaux chimiques (ou « *semiochemicals* » en anglais) sont produits par une grande variété de sources d'odeurs telles que l'urine, les matières fécales, les organes reproducteurs, les glandes sudoripares, la peau, la cuticule, la salive ou encore les glandes exocrines spécialisées (Eisenberg & Kleiman, 1972; Brown & Macdonald, 1985; Alberts, 1992; Bakshi, 2010; Bradbury & Vehrencamp, 2011).

II.2.1.2. Sources d'odeurs extrinsèques

a) Composés chimiques d'origine végétale

Les signaux chimiques peuvent être également des produits dérivés de plantes. En effet, les plantes possèdent des voies métaboliques différentes de celles des animaux, et peuvent donc synthétiser certains composés que les animaux sont incapables de produire (e.g. les composés terpénoïques ou aromatiques). En tant que base de la chaîne alimentaire, les plantes transmettent ainsi ces composés aux animaux qui peuvent alors les utiliser pour attirer des partenaires ou encore pour se défendre contre des prédateurs. Par exemple, les mâles de certaines espèces d'abeilles *Euglossini* collectent des parfums floraux d'orchidées qui seront ensuite libérés lors de la parade nuptiale afin d'attirer les femelles (Bembé, 2004; Eltz, Sager, & Lunau, 2005). De plus, certains lépidoptères utilisent des composés secondaires toxiques issus de plantes pour dissuader les prédateurs (Nishida, 2002), et un exemple bien connu est celui du papillon monarque (*Danaus plexippus*). Les chenilles de cette espèce se nourrissent de plantes du genre *Asclepias* qui contiennent des caroténoïdes toxiques qu'ils vont accumuler dans leur corps (Agrawal *et al.*, 2012). Ces substances vont alors rendre les chenilles émétiques pour les oiseaux (Brower, van Brower, & Corvino, 1967). Ces caroténoïdes confèrent alors au monarque sa couleur orange vive qui sert de signal aposématique.

b) Composés chimiques d'origine bactérienne

Pour finir, les signaux chimiques peuvent également dériver de sous-produits bactériens chez certaines espèces. Les bactéries présentes au niveau des sources d'odeurs endogènes peuvent dégrader les composés chimiques non volatiles (i.e. les grands composés qui sont donc plus lourds) en composés plus volatiles (i.e. plus petits) (Archie & Theis, 2011). Par exemple, une expérience menée en laboratoire sur le rat a mis en évidence que les femelles dont la flore bactérienne avait été détruite par traitement antibiotique n'étaient plus attractives pour les mâles par rapport aux femelles n'ayant pas subi le traitement (Merkx, Slob, & Van Der Werff Ten Bosch, 1988).

II.2.2. Dissémination des signaux chimiques : l'exemple du marquage olfactif

Une fois produits, les signaux chimiques sont disséminés de différentes manières afin de parvenir aux individus receveurs. Les animaux peuvent alors déposer leur odeur soit sur un substrat (« *scent-marking* » en anglais ; Ralls, 1971; Johnson, 1973), soit sur leur propre corps. C'est le cas notamment des oiseaux marins qui répartissent sur leurs plumes les sécrétions de leur glande uropygienne qui jouent un rôle majeur dans l'imperméabilisation et la protection contre les parasites et les bactéries (Burger *et al.*, 2004; Martín-Vivaldi *et al.*, 2010). Les odeurs peuvent également tout simplement émaner des individus par simple diffusion (Bradbury & Vehrencamp, 2011).

II.2.2.1. Marquage olfactif passif

Le marquage passif consiste à déposer les signaux chimiques tout en réalisant des activités de routine. Par exemple, certaines espèces d'ongulés possèdent des glandes interdigitales au niveau de leurs sabots qui leur permettent de laisser des traces olfactives (e.g. Lawson, Putnam, & Fielding, 2000). Ce marquage permet, par exemple, aux mâles de suivre les femelles pendant la période de reproduction. Cependant, ce marquage a un coût car il permet également aux prédateurs de repérer leurs proies.

II.2.2.2. Marquage olfactif actif

Le marquage olfactif actif (« *scent-marking* » en anglais) est très répandu chez les espèces territoriales pour marquer les limites de leur territoire. Ce marquage olfactif fournit ainsi des informations sur l'occupation du territoire et sert de mesure préventive pour la défense du territoire. Cette méthode de défense « passive », est très courante chez les mammifères (Ralls, 1971; Gosling, 1982). Dans la plupart des cas, les sécrétions odorantes sont déposées par un frottement des sources d'odeurs sur des éléments présents sur le territoire tels que des arbres, des souches, des rochers, ou encore le long des limites de territoires et autour des terriers. Ces marques olfactives sont alors persistantes dans le temps car les composés les plus lourds vont permettre de fixer les composés les plus volatiles sur le substrat, retardant ainsi leur évaporation et leur dégradation.

II.2.3. Chémoréception des signaux chimiques

La communication chimique implique donc que des molécules chimiques plus ou moins volatiles émises par un individu émetteur, de manière intentionnelle (e.g. marquage) ou non (e.g. diffusion de l'odeur corporelle), soient captées puis traitées par un ou plusieurs individus receveurs, afin de leur permettre de répondre de manière appropriée à l'information perçue (Bradbury & Vehrencamp, 2011; Wyatt, 2014). Ces signaux chimiques agissent alors comme des messagers qui fournissent des informations sur l'émetteur. Cependant, ils ne sont pas toujours spécifiques d'un receveur car la plupart ne peuvent pas être dirigés vers un destinataire particulier. Par exemple, le marquage vise un ensemble de receveurs, et non un receveur particulier (Eisenberg & Kleiman, 1972). Les molécules chimiques émises par l'individu émetteur sont alors détectées par les récepteurs olfactifs de l'individu receveur soit par contact direct (e.g. les antennes d'insectes), soit par des comportements spécifiques dont le principal est le reniflement (Bradbury & Vehrencamp, 2011; Wyatt, 2014). Chez les vertébrés, les principaux sous-systèmes chimiosensoriels sont le système olfactif principal (MOS : « *main olfactory system* » en anglais) et, pour ceux qui en sont dotés, le système olfactif accessoire (AOS : « *accessory olfactory system* » en anglais) présent notamment chez les rongeurs (Mucignat-Caretta, 2010). En fonction de l'espèce, les signaux chimiques vont être détectés par l'un et/ou l'autre des systèmes olfactifs (e.g. Kelliher, 2007; Munger, Leinders-Zufall, & Zufall, 2009).

II.3. Les méthodes d'étude de la communication chimique

De nombreuses études ont mis en évidence que les odeurs agissent comme des **messagers** qui fournissent des informations sur l'émetteur, et jouent un rôle essentiel dans la médiation des comportements sociaux et reproductifs (e.g. Johansson & Jones, 2007; Mason & Parker, 2010; Wyatt, 2014). Pour cela, deux méthodes différentes mais complémentaires sont utilisées : 1) les expériences comportementales, et 2) l'étude de la composition chimique de ces signaux obtenue par analyse chimique, par passage en chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse par exemple (Drea *et al.*, 2013; Gabirot *et al.*, 2016). Les **expériences comportementales** vont permettre de mettre en évidence l'utilisation de l'odeur par les individus (on parlera donc de signal), et

d'avoir une idée sur l'information d'intérêt susceptible d'être renseignée par les odeurs et utilisée par les individus. Cependant, les expériences comportementales ne permettent pas d'identifier les molécules impliquées dans ce signal, et ne sont donc pas suffisantes pour la compréhension du rôle des odeurs dans la communication animale. D'un point de vue historique, les premières preuves de l'implication des odeurs dans les comportements animaux ont été des expériences comportementales, car les technologies requises pour les **analyses chimiques** sont apparues bien après. En négligeant ainsi l'étude de la composition chimique des sécrétions odorantes nous avons provoqué un réel biais dans notre compréhension du rôle de la communication chimique dans les comportements sociaux et reproductifs chez les animaux. Les analyses chimiques sont indispensables pour identifier les composés chimiques d'intérêt (Drea *et al.*, 2013; Wyatt, 2014), il est donc nécessaire de combiner ces deux approches pour mieux comprendre le rôle des messagers chimiques dans les comportements animaux. Ces deux types d'approches ont permis de mettre en évidence que ce mode de communication est utilisé dans de nombreux contextes et chez de nombreux taxa (e.g. Cardé & Millar, 2004; Burger, 2005; Müller-Schwarze, 2006; Houck, 2009; Mason & Parker, 2010; Breithaupt & Thiel, 2011; Campagna *et al.*, 2012; Wyatt, 2014), mais je ne développerai dans la suite de cette introduction uniquement la communication chimique dans les contextes de reproduction et d'interactions sociales.

II.4. La communication chimique dans un contexte de reproduction

II.4.1. Trouver un partenaire

Trouver un partenaire sexuel nécessite plusieurs processus dans lesquels la communication chimique joue un rôle important. Le premier processus consiste à reconnaître un congénère, et plusieurs études ont montré que les signaux chimiques peuvent renseigner sur l'espèce (e.g. Zhang *et al.*, 2003; Zabarar *et al.*, 2005; delBarco-Trillo *et al.*, 2011, 2012). Le second processus est de reconnaître un congénère du sexe opposé. Là encore, les signaux chimiques peuvent renseigner sur le sexe des individus (e.g. MacDonald *et al.*, 2008; Kean *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2014). Enfin, le troisième processus implique de localiser un partenaire potentiel (i.e. réceptif) et d'être présent au bon

moment pour le féconder (e.g. Estrada *et al.*, 2010), or nous avons vu précédemment que des signaux chimiques sont utilisés pour localiser des partenaires potentiels, en particulier chez les insectes (e.g. Slessor *et al.*, 2005).

Chez les mammifères, les signaux chimiques peuvent permettre aux mâles d'évaluer la réceptivité des femelles. Par exemple, les éléphants d'Asie mâles (*Elephas maximus*) sont capables de détecter les phéromones émises dans l'urine des femelles, leur permettant de savoir lorsque celles-ci entrent en œstrus (Rasmussen *et al.*, 2003; Rasmussen, Krishnamurthy, & Sukumar, 2005). Il est également connu que la glande clitoridienne des rats (*Rattus norvegicus*) fournit des informations sur la synchronisation de l'œstrus chez les femelles et joue un rôle attractif pour les mâles (Achiraman *et al.*, 2011). De plus, il a également été montré que les odeurs produites par les différentes glandes présentes chez le maki catta (*Lemur catta*) renseignent sur la réceptivité des femelles (Scordato, Dubay, & Drea, 2007), ce qui les rend attractives lors de la période favorable pour l'accouplement (Drea, 2007).

II.4.2. Communication chimique et compétition intrasexuelle

La communication chimique est impliquée dans plusieurs formes de compétition entre mâles. Par exemple, dans la majorité des espèces de papillons de nuit, les mâles parcourent de très grandes distances à la recherche de partenaires potentiels. Les femelles, quant à elles, ne produisent qu'une très petite quantité de phéromones, ce qui va sélectionner les mâles pourvus d'une bonne capacité à détecter ces phéromones et qui sont donc efficaces lors de leur recherche de partenaires (Cardé & Haynes, 2004). Les femelles ne se reproduisant qu'avec le ou les premiers arrivants produiront alors des fils performants pour la recherche de partenaires. Par conséquent, cette forte sélection pour être le premier arrivé a conduit à une plus grande sensibilité des mâles pour détecter les phéromones émises par les femelles et favoriser ainsi l'accouplement, comme en témoignent les antennes très développées des mâles (Symonds, Johnson, & Elgar, 2012).

Les signaux chimiques ne sont toutefois pas impliqués dans des combats directs entre mâles comme peuvent l'être les signaux visuels (e.g. l'exhibition d'armements). Cependant, ils peuvent constituer des signaux fiables de l'état de santé des mâles ou

encore de leur compétitivité, qui seront utilisés lors de l'évaluation des concurrents. Ainsi, chez le mandrill (*Mandrillus sphinx*) ou le castor commun (*Castor fiber*), leurs signaux chimiques informent sur le statut social des mâles (Setchell *et al.*, 2010b; Tinnesand *et al.*, 2013), ce qui donne une indication sur leur compétitivité à leurs concurrents.

Enfin, chez les espèces territoriales, les mâles peuvent marquer leur territoire avec des marques olfactives, et ainsi indiquer aux autres mâles concurrents qu'ils pénètrent sur un territoire déjà occupé (Gosling & Roberts, 2001). Par exemple, les souris mâles se battent pour acquérir un territoire et le gagnant marque son territoire avec son urine pour indiquer qu'il en est le propriétaire et par conséquent qu'il est suffisamment compétitif (Hurst, 2009).

II.4.3. Communication chimique et sélection intersexuelle

Dans la sélection intersexuelle, les signaux chimiques peuvent être utilisés par les femelles pour évaluer la qualité des mâles, et influencer leur choix de partenaire (Johansson & Jones, 2007). Les signaux chimiques interviennent alors aussi bien dans le choix pour des bénéfices directs qu'indirects.

II.4.3.1. Communication chimique et bénéfices directs

Les signaux chimiques à courte portée peuvent parfois intervenir dans l'évaluation des bénéfices directs que le mâle peut apporter à la femelle. Ces bénéfices directs permettront alors d'augmenter la survie des descendants. Par exemple, les mâles de certaines espèces de lépidoptères offrent des composés anti-prédation aux femelles et annoncent la qualité de ces molécules défensives par un signal honnête qui est une phéromone qui dérive du précurseur de ces molécules défensives (Conner *et al.*, 1980; Eisner & Meinwald, 2003). Ces bénéfices peuvent aussi être liés à la qualité du territoire défendu par le mâle. Chez la souris domestique (*Mus musculus*), il a été montré que les femelles sentent les marques d'urine déposées par les mâles territoriaux possédants un territoire, et apprennent ces odeurs qui sont des mélanges de composés chimiques caractéristiques de ces mâles particuliers. Les femelles préfèrent alors se reproduire avec les mâles qu'elles vont pouvoir reconnaître grâce à leur odeur et par conséquent les mâles

de qualité, propriétaires d'un territoire (Roberts *et al.*, 2010, 2012). Les signaux chimiques peuvent enfin être utilisés pour évaluer la fertilité des mâles lorsque celle-ci est corrélée à la taille ou à l'âge des mâles (Johansson & Jones, 2007). Par exemple, chez le lézard ibérique (*Lacerta monticola*), les femelles utilisent des signaux chimiques pour évaluer l'âge des partenaires potentiels et préfèrent s'accoupler avec des mâles plus âgés (López, Aragón, & Martín, 2003). L'odeur peut également être un indicateur de la maturité sexuelle des individus (e.g. Linklater *et al.*, 2013; Vaglio *et al.*, 2016; Spence-Aizenberg *et al.*, 2018).

II.4.3.2. Communication chimique et bénéfices indirects

Les signaux chimiques sont surtout utilisés dans l'évaluation de la qualité du mâle, et les femelles peuvent alors choisir un mâle de qualité grâce à ces indices chimiques (Johansson & Jones, 2007; Thomas, 2011). Par exemple, les femelles de la teigne du cacao (*Ephestia elutella*) sont plus susceptibles de s'accoupler avec des grands mâles qui produisent plus de phéromones que les petits mâles. En effet, s'accoupler avec des grands mâles permet alors aux femelles de produire plus de descendants qui survivront mieux jusqu'au stade nymphal par rapport aux descendant issus de mâles plus petits (Phelan & Baker, 1986).

Une réelle avancée a été faite lorsqu'il a été montré que l'odeur pouvait directement renseigner sur le génotype des individus. Yamazaki *et al.* (1976) ont produit des souches de souris ne différant qu'aux loci du CMH, et montré que des congénères entraînés peuvent distinguer l'odeur de l'urine d'individus de souches différentes. Plus tard, plusieurs études ont identifié comment des produits de dégradation des molécules du CMH peuvent se retrouver dans l'urine et ainsi renseigner sur le génotype des individus au CMH (e.g. Singer, Beauchamp, & Yamazaki, 1997; Leinders-Zufall *et al.*, 2004; Hurst, 2009). Dans ce contexte, l'odeur peut alors signaler la possession de bons allèles au CMH et donc sur des « bons gènes » à l'image de la queue du paon bleu (**Fig. 7**). Ainsi, quelques études ont mis en évidence ce lien entre odeur et génotype au CMH (Knapp, Robson, & Waterhouse, 2006; Setchell *et al.*, 2011; Leclaire *et al.*, 2014; Slade *et al.*, 2016).



Figure 7 : Les odeurs émises par les souris mâles sont attractives pour les femelles car elles sont représentatives de la qualité des mâles. Ces odeurs agissent donc, d'une certaine manière, comme la queue d'un paon bleu pour attirer les femelles.

© Sarah Bush

De la même manière, l'odeur peut aussi être utilisée par les femelles pour évaluer la compatibilité génétique des partenaires potentiels selon l'idée que des individus génétiquement semblables devraient produire des odeurs proches alors que des individus génétiquement différents devraient avoir des odeurs différentes (i.e. la « covariance gènes-odeurs » ; Johnston, 2003; Todrank & Heth, 2003; Johansson & Jones, 2007). Des expériences de choix ont ainsi montré que chez de nombreuses espèces les femelles préfèrent s'accoupler avec des partenaires dissimilaires au CMH (e.g. Ziegler, Kentenich, & Uchanska-Ziegler, 2005; Eizaguirre *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010a; Juola & Dearborn, 2012; Strandh *et al.*, 2012). Cela indique que les femelles sont capables d'évaluer la compatibilité génétique au CMH à partir de signaux chimiques et d'améliorer ainsi l'hétérozygotie au CMH et la valeur sélective de leurs descendants (Trivers, 1972; Tregenza & Wedell, 2000). Dans le même esprit, il a été suggéré que l'odeur doit pouvoir renseigner sur la compatibilité génétique au niveau du génome entier. Ainsi des expériences de choix ont démontré chez de nombreuses espèces que les femelles évitent de s'accoupler avec des mâles génétiquement proches (i.e. apparentés ; e.g. Gerlach & Lysiak, 2006; Bonadonna & Sanz-Aguilar, 2012; Leclaire *et al.*, 2012), ce qui signifie que les femelles ont accès à cette information.

Pour aller plus loin, il est important de comprendre comment l'odeur individuelle peut renseigner sur la compatibilité génétique. Quelles sont les molécules ou les mélanges de molécules (« *signature mixture* ») qui sont impliqués ? Cela reste encore largement méconnu. Récemment, des études ont montré une corrélation entre la distance chimique et la distance génétique des individus, testant ainsi directement l'hypothèse de la « covariance gènes-odeur ». Cette corrélation commence à être bien documentée chez les insectes où les hydrocarbures cuticulaires semblent jouer un rôle important dans ce signalement (e.g. Dronnet *et al.*, 2006; Metzger *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2013; Falcón *et al.*, 2014; Lihoreau, Rivault, & van Zweden, 2016), mais est encore peu documentée chez les oiseaux et les mammifères. Quelques études ont cependant mis en évidence une corrélation positive entre la distance chimique et la distance génétique au CMH (chez les oiseaux : Leclaire *et al.*, 2014; Slade *et al.*, 2016; et chez les primates: Knapp *et al.*, 2006; Setchell *et al.*, 2011) ou avec des microsatellites (e.g. Liu *et al.*, 2008; Boulet, Charpentier, & Drea, 2009; Zhang & Zhang, 2011).

II.5. Signaux chimiques et interactions sociales

Les signaux chimiques jouent également un rôle essentiel dans la médiation des comportements sociaux (Mason & Parker, 2010; Wyatt, 2014).

III.5.1. Reconnaissance mère-enfant

Le rôle des signaux chimiques dans la reconnaissance mère-enfant a été démontré chez de nombreuses espèces de mammifères, y compris chez l'Homme (e.g. Mizuno *et al.*, 2004; Schaal *et al.*, 2009; Vaglio, 2009; Vaglio *et al.*, 2009), et a fait l'objet d'études approfondies chez certaines espèces. Chez le mouton (*Ovis aries*) par exemple, tous les agneaux de l'année naissent à peu près au même moment dans le troupeau, et chaque mère doit être capable de reconnaître sa progéniture : les mères apprennent l'odeur de leur agneau dans les premières heures qui suivent sa naissance (Lévy & Keller, 2008, 2009). Ainsi, un agneau orphelin pourra être accepté et adopté par une autre mère uniquement si le contact se fait pendant cette période précoce. Les mères apprennent donc l'odeur globale de leur agneau pour le reconnaître et non les odeurs engendrées par les gènes

maternels présents dans le génome de leur petit (Romeyer *et al.*, 1993). Des études ont également montré que les descendants apprennent l'odeur de leurs parents, comme chez l'humain où les nouveau-nés se tournent vers l'odeur de leur mère, apprise peu après leur naissance (Schaal *et al.*, 2009).

II.5.2. Reconnaissance des apparentés

Les signaux chimiques interviennent également lors de la reconnaissance des individus apparentés (« *kin recognition* » en anglais ; Johnston, 2003; Mateo, 2003; Mateo & Johnston, 2003). Nous avons vu que cela peut permettre d'éviter des accouplements consanguins, mais cela permet aussi d'orienter les comportements affiliatifs (e.g. soins, défense) vers les apparentés. Par exemple, chez les spermophiles de Belding (*Spermophilus beldingi*), les mères, les filles et les sœurs privilégient les individus qui leurs sont apparentés (comportent népotique), en s'avertissant mutuellement de la présence de prédateurs et en protégeant ensemble leur progéniture (Holmes, 2004). Les membres d'un groupe vont avoir tendance à être apparentés mais souvent la limite entre apparenté et familiarité est assez floue. En effet, des expériences de manipulation croisée d'odeurs ont montré que les odeurs des frères et sœurs (appartenant à une même portée) ou des parents sont apprises pendant la période de sevrage. Les individus sont alors moins agressifs envers des non-apparentés familiers qu'envers des individus complètement inconnus (Mateo, 2009). Cependant, chez le rat épineux du Caire (*Acomys cahirinus*), des expériences comportementales ont mis en évidence que des sœurs et demi-sœurs d'une même portée sont moins agressives envers les sœurs qu'envers les demi-sœurs (Holmes & Sherman, 1982), suggérant un appariement phénotypique qui puisse leur permettre de faire cette distinction. L'appariement phénotypique (« *phenotype matching* » en anglais) est un processus de reconnaissance qui implique une comparaison de l'odeur de l'émetteur avec sa propre odeur, ou bien avec l'odeur de parents présents dans le groupe familial par exemple (e.g. Lacy & Sherman, 1983; Heth, Todrank, & Johnston, 1998; Hare *et al.*, 2003; Till-Bottraud & de Villemereuil, 2016). Ce processus de reconnaissance permettrait aux individus de se comporter différemment avec des apparentés qu'ils n'auraient encore jamais rencontré (i.e. des apparentés non familiers). En effet, des tests réalisés en laboratoire, sur les spermophile de Belding, ont mis en évidence que les individus sont

moins agressifs envers des frères et sœurs non familiaux qu'envers des non-frères et non-sœurs non familiaux (e.g. Holmes, 1986).

II.5.3. Odeur de famille/groupe/clan

Chez les mammifères sociaux vivant en groupes familiaux (e.g. le castor du Canada, *Castor canadensis*), ou encore en clan (e.g. la hyène tachetée, *Crocuta crocuta*), l'expulsion d'individus étrangers au groupe est fréquente. Ce comportement repose alors sur une reconnaissance mutuelle de l'ensemble des membres du groupe qui sont généralement apparentés (e.g. chez *C. canadensis*, Sun & Müller-Schwarze, 1998a,b ; et chez *C. crocuta*, Drea *et al.*, 2002). Cependant, en fonction de la structure sociale et du mode de dispersion des juvéniles, chez de nombreuses espèces de mammifères, des nouveaux membres (i.e. les individus nouvellement adultes) pourront rejoindre le groupe social. Etant donné que ces nouveaux individus viennent de l'extérieur, ils ne seront pas apparentés au groupe qu'ils rejoignent. Ainsi, bien qu'il puisse y avoir des différences de comportement liées à l'appartenance entre les individus du groupe, si le groupe fonctionne comme une unité sociale, alors les membres du groupe devront reconnaître les individus non apparentés nouvellement arrivés en tant que membre du groupe social.

De nombreux mammifères sociaux font ce qu'on appelle de l'allomarquage. L'allomarquage est le fait de marquer les autres membres du groupe social, et est souvent fait par le dominant du groupe. Par exemple, les blaireaux Européen (*Meles meles*) se marquent les uns les autres avec leurs glandes odorantes (Kruuk, Gorman, & Leitch, 1984). Tous les membres du clan partagent alors une identité olfactive commune, dominée par l'odeur du mâle dominant.

Chez de nombreux insectes sociaux, le principal mécanisme de reconnaissance semble être une étiquette d'odeur de colonie qui va être produite par chaque membre de la colonie et apprise par chacun d'eux. Les différences dans le mélange de ces odeurs peuvent même donner aux colonies génétiquement similaires une odeur différente qui sera unique. Par exemple, chez certaines espèces de fourmis, les hydrocarbures cuticulaires sont les principaux signaux chimiques pour la reconnaissance des colonies (e.g. Lenoir *et al.*, 2001; d'Ettorre & Lenoir, 2009; van Zweden & d'Ettorre, 2010; Sturgis & Gordon,

2012). Et chez ces espèces, c'est la trophallaxie (i.e. le transfert de nourriture liquide entre individus) et le toilettage mutuel, qui vont créer un mélange de ces signaux de reconnaissance dans toute la colonie, et permettre ainsi une actualisation continue de l'odeur de la colonie (van Zweden & d'Ettorre, 2010; Bos & d'Ettorre, 2012).

II.5.4. Marquage et défense du territoire

Marquer son territoire avec des marques olfactives est un comportement commun à de nombreuses espèces de vertébrés terrestres territoriaux (e.g. Müller-Schwarze, 2006; Roberts, 2007; Martín & López, 2010; Font *et al.*, 2012). Les mammifères réalisent leur marquage olfactif par des sécrétions glandulaires, mais aussi par des marquages via les matières fécales et l'urine. Ces marquages sont alors généralement placés à des endroits stratégiques dans leur domaine vital ou leur territoire, souvent au niveau des limites de territoire (Gosling & Roberts, 2001). Trois théories principales expliquent l'évolution de ce marquage olfactif : le marquage peut 1) dissuader les intrus potentiels (« *the scent-fence hypothesis* » en anglais), 2) permettre à l'intrus de reconnaître le propriétaire du territoire s'il le rencontre, grâce à une reconnaissance de son odeur retrouvée autour du territoire (« *the scent-matching hypothesis* » en anglais), ou 3) établir des frontières en limite de territoire avec les concurrents voisins (« *the border-maintenance hypothesis* » en anglais) (Gosling & Roberts, 2001; Roberts, 2007). Par exemple, chez la souris grise (*Mus musculus domesticus*), les mâles dominants marquent abondamment leurs territoires (Hurst & Beynon, 2004). Si les mâles évaluent leurs adversaires potentiels en comparant leur odeur aux marques olfactives locales, ils seront moins susceptibles de se battre si ces odeurs sont les mêmes car elles indiquent que le mâle est le propriétaire, et donc compétitif (Roberts, 2007).

II.5.5. Reconnaissance individuelle

Les animaux sont également capables de reconnaître des individus particuliers en apprenant les identités olfactives de ces individus. Cette reconnaissance d'individus déjà rencontrés peut ainsi permettre d'avoir un comportement plus adapté. Cette discrimination des individus uniquement via l'odeur a été démontrée par des expériences

d'entraînement, par exemple chez la mangouste naine (*Helogale undulata*) qui est capable de distinguer ses congénères par leurs sécrétions des glandes anales (Rasa, 1973). Cette reconnaissance individuelle intervient dans de nombreux cas de figures, comme par exemple lors du choix de partenaire, par les souris femelles qui vont utiliser la correspondance des odeurs de marquage avec l'odeur des mâles présents pour identifier le propriétaire du territoire, ce qui semble indiquer une reconnaissance individuelle (Hurst, 2009; Hurst & Beynon, 2013). De plus, la reconnaissance individuelle semble également intervenir dans le phénomène du « *dear enemy* » (i.e. le fait d'être plus agressif envers des individus étrangers par rapport aux individus voisins qui sont connus), car les membres du groupe sont probablement capables de reconnaître leurs voisins via leur odeur (e.g. Stoddard *et al.*, 1990; Rosell & Bjørkøyli, 2002; Palphramand & White, 2007; Moser-Purdy & Mennill, 2016). La reconnaissance individuelle via l'odeur est également importante chez les espèces monogames, où il est nécessaire de reconnaître son partenaire sexuel. C'est le cas notamment chez le pétrel bleu (*Halobaena caerulea*) qui possède une odeur individuelle et est capable de reconnaître l'odeur de son partenaire (Mardon & Bonadonna, 2009; Mardon *et al.*, 2010).

III. La communication chimique chez les espèces sociales

III.1. Définition de la socialité

De manière générale il est possible de définir la socialité comme la « *tendance des organismes à vivre en groupe* » (Reiczigel *et al.*, 2008). Cependant, la définition de la socialité est plus complexe que cela, et est sans cesse ajustée par les chercheurs qui ont du mal à trouver un consensus quant à la définition à adopter (Costa & Fitzgerald, 2005; Wcislo, 2005; Rubenstein & Abbot, 2017; Kappeler, 2019). Le terme « *vivre en groupe* » signifie que plusieurs individus se sont regroupés pour vivre ensemble, et former un groupe social. Ce groupe social se caractérise donc par un système social particulier (composition du groupe social) mais aussi par les interactions sociales établies entre les membres du groupe (Kappeler & van Schaik, 2002). Le système social d'un groupe est caractérisé par trois composantes différentes, son organisation sociale, sa structure sociale et son régime d'appariement qui vont être propres à l'espèce et au groupe étudié (Kappeler & van

Schaik, 2002). Cependant, Kappeler (2019) a récemment ajouté une quatrième composante à sa définition du système social, les soins aux jeunes, car les aspects liés aux soins parentaux sont également important à prendre en compte (Rubenstein & Abbot, 2017).

III.2. Nécessité d'une communication complexe

La socialité et la communication sont extrêmement liées. En d'autres termes, cela reprend l'idée qu'à mesure que la complexité sociale augmente, une communication plus complexe pourrait être nécessaire pour gérer les interactions sociales qui en découlent, c'est ce qu'on appelle « l'hypothèse de la complexité sociale pour la complexité de la communication » (Freeberg, 2006; Freeberg, Dunbar, & Ord, 2012a; Freeberg, Ord, & Dunbar, 2012b; Krams *et al.*, 2012). En effet, chez les espèces sociales, les individus sont généralement impliqués dans un large éventail d'interactions avec divers partenaires sociaux, ce qui nécessite de transmettre plus d'informations et d'exprimer un plus large éventail d'états (Lamarck, 1809; Marler, 1977; Freeberg *et al.*, 2012a; Ord & Garcia-Porta, 2012). Freeberg *et al.* (2012a) mettent en avant plusieurs aspect de la socialité susceptibles d'affecter la façon dont les animaux communiquent entre eux. En effet, l'organisation sociale, qui se définit comme la taille du groupe social et sa composition en termes de sexe et d'âge des individus, mais aussi de liens de parentés qu'il y a entre les membres du groupe social, ainsi que la structure sociale, qui fait référence au type d'interactions sociales existantes entre les membres du groupe social (Kappeler & van Schaik, 2002; Kappeler, 2019), nécessitent des signaux capables d'informer sur ces différentes caractéristiques individuelles.

Dans le cas des espèces à reproduction coopérative, qui ont un degré de socialité des plus importants, le biais de reproduction est élevé car seule une partie du groupe se reproduit. Le couple de reproducteur est alors aidé par des subordonnés non reproducteurs (Silk, 2007). Chez les espèces à reproduction coopérative, ce biais crée une compétition intrasexuelle intense pour l'accès à la dominance (et donc à la reproduction) chez les deux sexes (Hauber & Lacey, 2005; Clutton-Brock *et al.*, 2006; Clutton-Brock & Huchard, 2013). Dans ce type de sociétés animales il est alors important de signaler son

statut social afin d'appuyer la hiérarchie mise en place au sein des groupes sociaux. En réalité, il est nécessaire que chacun des membres du groupe informe les autres membres de son rôle socio-démographique dans le groupe social (i.e. reproducteur ou non-reproducteur, subordonné ou dominant, mâle ou femelle, et ainsi de suite) (Freeberg *et al.*, 2012a).

Chez les espèces sociales de vertébrés, le rôle de la communication chimique dans les interactions sociales et reproductrices reste encore très largement méconnue, et en particulier chez les espèces à reproduction coopératives. De par leur organisation sociale particulière, ces espèces sont impliquées dans de nombreux échanges intra et intergroupes. De plus, relativement peu d'études impliquant des espèces sociales ont été réalisées en milieu naturel. C'est pourquoi au cours de ma thèse je me suis focalisée sur l'étude de la communication chimique chez une espèce à reproduction coopérative, en étudiant une population naturelle de marmottes Alpines.

III.3. L'exemple de la Marmotte alpine (*Marmota marmota*)

III.3.1. Généralités : socialité et communication chimique

La marmotte Alpine est une espèce idéale pour étudier le rôle de la communication chimique dans la médiation des interactions sociales et sexuelles. En effet, la marmotte Alpine est une espèce à reproduction coopérative qui vit en groupes familiaux de deux à vingt individus (Allainé, 2000), où un groupe familial est généralement composé d'un couple de dominants, d'individus subordonnés adultes (sexuellement matures mais qui ne se reproduisent pas) et d'individus subordonnés immatures (les individus immatures de 1 an et les marmottons) des deux sexes (Allainé *et al.*, 2000). Chez cette espèce, les individus subordonnés restent dans leur groupe familial jusqu'à ce qu'ils atteignent la maturité sexuelle à l'âge de deux ans. Ensuite, ces individus peuvent soit disperser pour acquérir un territoire et accéder à la reproduction, soit retarder leur dispersion et rester dans leur groupe familial (Allainé, 2000).

La marmotte Alpine, comme toutes les espèces de marmottes, possède trois types de glandes exocrines spécialisées : trois glandes anales, deux glandes jugales (également

appelées glandes orbitales) situées de manière bilatérale entre l'œil et l'oreille, et deux glandes buccales situées au niveau des deux coins de la bouche, qui peuvent être utilisées pour communiquer (Rausch & Bridgens, 1989; Blumstein & Henderson, 1996). Bien que jusqu'à présent seule la glande jugale, utilisée lors du marquage du territoire (Bel, Porteret, & Coulon, 1995; Bel *et al.*, 1999), est été étudiée, la communication chimique semble particulièrement importante dans la médiation des interactions sociales et sexuelles chez cette espèce sociale (Armitage, 2014).

III.3.2. Une espèce sociale et monogame

La marmotte Alpine est une espèce socialement monogame. Dans chaque groupe familial seul le couple de dominants se reproduit tandis que les subordonnés sexuellement matures subissent une suppression de leur reproduction (Hackländer, Möstl, & Arnold, 2003). Les subordonnés qui retardent leur dispersion peuvent alors devenir des compétiteurs potentiels pour l'accès à la dominance et donc à la reproduction. Dans ce cas, la communication chimique pourrait intervenir dans la médiation des interactions intraspécifiques. Dans un contexte de compétition intrasexuelle on peut alors s'attendre à ce que les signaux chimiques renseignent sur la maturité sexuelle, le statut social et le sexe des individus chez cette espèce. En effet, les dominants des deux sexes peuvent être en compétition pour l'accès à la reproduction avec les subordonnés sexuellement matures présents dans le groupe familial, il serait donc important d'avoir des informations sur les caractéristiques individuelles des membres du groupe afin de pouvoir identifier ces compétiteurs potentiels.

Les mâles dominants monopolisent généralement avec succès toute la reproduction, mais parfois il se produit des paternités hors-couple (Goossens *et al.*, 1998; Cohas *et al.*, 2006). La présence et le nombre de marmottons issus de paternités hors-couples augmentent lorsque les femelles dominantes sont associées à un partenaire social qui est soit génétiquement trop similaire, soit génétiquement trop dissimilaire à elles (Cohas *et al.*, 2008; Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016) ou trop similaire au CMH de classe II (Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). Les femelles peuvent alors choisir de cocufier leur mâle social afin d'ajuster leur choix de partenaire lorsque le mâle social n'est pas optimal, et

donc de s'accoupler avec des mâles possédant des caractéristiques génétiques particulières. En effet, il a été montré que les paternités hors-couple ont des conséquences sur la valeur sélective des descendants produits. Plus précisément, il a été constaté qu'au sein d'une même portée, les marmottons issus de paternités hors-couple ont un meilleur taux de survie et une probabilité d'accéder au statut de dominance plus grande que les marmottons produits par le mâle social (Cohas *et al.*, 2007). Les signaux chimiques pourraient alors être utilisés lors du choix de partenaire si ceux-ci renseignent sur l'apparenté et sur le génotype au CMH des individus.

III.3.3. Une espèce territoriale

La marmotte Alpine est une espèce territoriale et les interactions sociales au sein des groupes familiaux sont fréquentes et généralement affiliatives, tandis que les interactions entre individus de groupes familiaux différents sont rares et agonistiques (Perrin, Allainé, & Le Berre, 1993). Les territoires sont principalement défendus par les individus dominants (Allainé, 2000) qui marquent les limites de leur territoire par marquages olfactifs (Bel *et al.*, 1995, 1999). La communication chimique pourrait alors intervenir dans la médiation des interactions sociales, en renseignement sur l'appartenance des individus à tel ou tel groupe social, ou encore sur le statut social des individus, en indiquant qu'ils sont les propriétaires du territoire.

IV. Objectifs de la thèse

Le sujet de ma thèse se situe à l'interface entre l'écologie chimique et l'écologie comportementale et se concentre sur le rôle de la communication chimique dans les contextes de sélection sexuelle et d'interaction entre groupes chez une espèce sociale vivant en milieu naturel.

Suite à l'introduction ci-dessus, le second chapitre présente le matériel et les méthodes que j'ai utilisés pour réaliser cette thèse. Dans un premier temps, je présenterai le modèle d'étude qu'est la marmotte Alpine (*M. marmota*), puis le site d'étude. Pour finir je m'attarderai sur la collecte des échantillons qui nécessite un soin tout particulier afin d'éviter toute contamination par des composés chimiques exogènes aux marmottes, et

j'expliquerai en quoi consiste la méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.

La communication chimique étant impliquée dans des contextes de sélection sexuelle, je me suis intéressée dans un premier temps à son rôle dans un contexte de compétition intrasexuelle chez la marmotte Alpine. En effet, les espèces à reproduction coopérative ont un biais reproducteur élevé ce qui provoque une compétition intrasexuelle intense au sein des groupes pour accéder à la dominance, et donc à la reproduction. Dans cet **Article 1**, j'ai mis en évidence que les sécrétions des glandes anales de marmottes renseignent sur la maturité sexuelle des individus mais également sur le sexe et le statut social des adultes. Ces informations pourraient alors permettre aux individus dominants d'orienter leur agressivité uniquement vers les compétiteurs potentiels, c'est-à-dire les individus subordonnés sexuellement mature de même sexe. La communication chimique pourrait donc être impliquée dans la compétition sexuelle intragroupe chez la marmotte Alpine.

Dans un second temps, je me suis focalisée sur l'autre pan de la sélection sexuelle, à savoir la sélection intersexuelle et plus particulièrement le choix des femelles. Chez la marmotte Alpine, le choix des femelles se fait uniquement lorsque celles-ci ont le choix de réaliser des paternités hors-couple. En effet, chez cette espèce les femelles choisissent généralement de cocufier leur partenaire social lorsque celui-ci n'est pas optimal génétiquement, ce qui suggère qu'elles ont accès à cette information. J'ai donc essayé de comprendre si l'odeur des sécrétions des glandes anales pouvait contenir des informations sur les caractéristiques génétiques des individus sexuellement matures. Dans cet **Article 2**, j'ai mis en évidence que l'odeur des marmottes pouvait renseigner sur le génotype des individus, mais pas sur leur génotype au CMH de classe II. Mes résultats suggèrent alors que l'odeur peut être impliquée dans l'évaluation du partenaire et permettre d'éviter aux femelles de se reproduire avec des apparentés.

Chez les espèces sociales, la communication chimique joue également un rôle important dans les interactions sociales, et plus particulièrement dans les relations intergroupes. En effet, les espèces sociales occupent généralement un territoire qu'elles

défendent. L'hypothèse du « dear-enemy phenomenon » indique que les membres d'un groupe social auront tendance à se méfier plus (et donc à être plus agressifs) des individus étrangers (i.e. des individus qu'ils n'ont jamais vu) que de leurs voisins qu'ils côtoient à leurs limites de territoire. Dans l'**Article 3**, j'ai testé cette hypothèse chez la marmotte Alpine, mais il semblerait que chez cette espèce à reproduction coopérative tout individu extérieur à la famille, qu'il soit voisin ou étranger, est considéré comme un intrus qu'il faut chasser du territoire.

Dans le dernier chapitre, je discuterai de mes principaux résultats de thèse, et de leurs implications dans une meilleure compréhension du rôle de la communication chimique dans des contextes de sélection sexuelle et d'interactions sociales intra et intergroupes chez les espèces sociales, et je donnerai des perspectives de recherche supplémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Achiraman S, Archunan G, Abirami B, Kokilavani P, Suriyakalaa U, SankarGanesh D, Kamalakkannan S, Kannan S, Habara Y, Sankar R. 2011. Increased squalene concentrations in the clitoral gland during the estrous cycle in rats: an estrus-indicating scent mark? *Theriogenology* **76**: 1676–1683.
- Agrawal AA, Petschenka G, Bingham RA, Weber MG, Rasmann S. 2012. Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions. *New Phytologist* **194**: 28–45.
- Alberts AC. 1992. Constraints on the design of chemical communication systems in terrestrial vertebrates. *The American Naturalist* **139**: S62–S69.
- Albone ES. 1984. *Mammalian Semiochemistry*. New York: John Wiley.
- Allainé D. 2000. Sociality, mating system and reproductive skew in marmots: evidence and hypotheses. *Behavioural Processes* **51**: 21–34.
- Allainé D, Brondex F, Graziani L, Coulon J, Till-Bottraud I. 2000. Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behavioral Ecology* **11**: 507–514.
- Andersson M. 1994. *Sexual Selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Andersson M, Simmons LW. 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 296–302.
- Archie EA, Theis KR. 2011. Animal behaviour meets microbial ecology. *Animal Behaviour* **82**: 425–436.
- Armitage KB. 2014. *Marmot biology: sociality, individual fitness, and population dynamics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Arnqvist G. 2006. Sensory exploitation and sexual conflict. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**: 375–386.
- Bakshi S. 2010. Scent gland and its behavioral function in small mammals: a review. *Agricultural reviews* **31**: 157–171.
- Bel MC, Coulon J, Sreng L, Allainé D, Bagnères AG, Clément JL. 1999. Social signals involved in scent-marking behavior by cheek-rubbing in Alpine marmots (*Marmota marmota*). *Journal of Chemical Ecology* **25**: 2267–2293.
- Bel MC, Porteret C, Coulon J. 1995. Scent deposition by cheek rubbing in the alpine marmot (*Marmota marmota*) in the French Alps. *Canadian Journal of Zoology* **73**: 2065–2071.
- Bembé B. 2004. Functional morphology in male euglossine bees and their ability to spray fragrances (Hymenoptera, Apidae, *Euglossini*). *Apidologie* **35**: 283–291.
- Bennett ATD, Lloyd MH, Cuthill IC. 1996. Ant-derived formic acid can be toxic for birds. *Chemoecology* **7**: 189–190.

- Bernatchez L, Landry C. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 363–377.
- Blumstein DT, Henderson SJ. 1996. Cheek-rubbing in golden marmots (*Marmota caudata aurea*). *Journal of Zoology* **238**: 113–123.
- Bonadonna F, Sanz-Aguilar A. 2012. Kin recognition and inbreeding avoidance in wild birds: the first evidence for individual kin-related odour recognition. *Animal Behaviour* **84**: 509–513.
- Bonneaud C, Chastel O, Federici P, Westerdahl H, Sorci G. 2006. Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 1111–1116.
- Bos N, d’Ettorre P. 2012. Recognition of social identity in ants. *Frontiers in Psychology* **3**: 1–6.
- Boulet M, Charpentier MJ, Drea CM. 2009. Decoding an olfactory mechanism of kin recognition and inbreeding avoidance in a primate. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 281.
- Bradbury JW, Vehrencamp SL. 2011. *Principles of Animal Communication*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Breithaupt T, Thiel M. 2011. *Chemical Communication in Crustaceans*. New York: Springer.
- Brodmann J, Twele R, Francke W, Yi-bo L, Xi-qiang S, Ayasse M. 2009. Orchid mimics honey bee alarm pheromone in order to attract hornets for pollination. *Current Biology* **19**: 1368–1372.
- Brower L, van Brower J, Corvino J. 1967. Plant poisons in a terrestrial food chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **57**: 893–898.
- Brown RE, Macdonald DW. 1985. *Social Odours in Mammals*. Oxford: Clarendon Press.
- Burger BV. 2005. Mammalian semiochemicals. *Topics in Current Chemistry* **240**: 231–278.
- Burger BV, Reiter B, Borzyk O, du Plessis MA. 2004. Avian exocrine secretions. I. Chemical characterization of the volatile fraction of the uropygial secretion of the green woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Journal of Chemical Ecology* **30**: 1603–1611.
- Burley N, Coopersmith CB. 1987. Bill color preferences of zebra finches. *Ethology* **76**: 133–151.
- Burley NT, Price DK, Zann RA. 1992. Bill color, reproduction and condition effects in wild and domesticated zebra finches. *The Auk* **109**: 13–23.
- Butenandt A, Beckmann R, Stamm D, Hecker E. 1959. Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinner *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforsch.* **14b**: 283–284.
- Byers JA. 2005. A cost of alarm pheromone production in cotton aphids, *Aphis gossypii*. *Naturwissenschaften* **92**: 69–72.

- Campagna S, Mardon J, Celerier A, Bonadonna F. 2012.** Potential semiochemical molecules from birds: a practical and comprehensive compilation of the last 20 years studies. *Chemical Senses* **37**: 3–25.
- Cardé RT, Haynes KF. 2004.** Structure of the pheromone communication channel in moths. In: Cardé RT, Miller JG, eds. *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, 283–332.
- Cardé RT, Millar JG. 2004.** *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Charra R, Datiche F, Gigot V, Schaal B, Coureaud G. 2013.** Pheromone-induced odor learning modifies Fos expression in the newborn rabbit brain. *Behavioural Brain Research* **237**: 129–140.
- Charrier I, Mathevon N, Jouventin P. 2002.** Recognition of a pup's voice by subantarctic fur seal mothers. *The Journal of Experimental Biology* **205**: 603–612.
- Charrier I, Mathevon N, Jouventin P. 2003.** Vocal signature recognition of mothers by fur seal pups. *Animal Behaviour* **65**: 543–550.
- Clutton-Brock TH, Hodge SJ, Spong G, Russell AF, Jordan NR, Bennett NC, Sharpe LL, Manser MB. 2006.** Intrasexual competition and sexual selection in cooperative mammals. *Nature* **444**: 21–28.
- Clutton-Brock TH, Huchard E. 2013.** Social competition and selection in males and females. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**: 20130074.
- Cohas A, Bonenfant C, Gaillard JM, Allainé D. 2007.** Are extra-pair young better than within-pair young? A comparison of survival and dominance in alpine marmot. *Journal of Animal Ecology* **76**: 771–781.
- Cohas A, Yoccoz NG, Bonenfant C, Goossens B, Genton C, Galan M, Kempenaers B, Allainé D. 2008.** The genetic similarity between pair members influences the frequency of extrapair paternity in alpine marmots. *Animal Behaviour* **76**: 87–95.
- Cohas A, Yoccoz NG, Da Silva A, Goossens B, Allainé D. 2006.** Extra-pair paternity in the monogamous alpine marmot (*Marmota marmota*): the roles of social setting and female mate choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59**: 597–605.
- Coleman SW. 2009.** Taxonomic and sensory biases in the mate-choice literature: there are far too few studies of chemical and multimodal communication. *Acta Ethologica* **12**: 45–48.
- Conner WE, Eisner T, Vander Meer RK, Guerrero A, Ghiringelli D, Meinwald J. 1980.** Sex attractant of an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): a pulsed chemical signal. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **7**: 55–63.
- Costa JT, Fitzgerald TD. 2005.** Social terminology revisited: where are we ten years later? *Annales Zoologici Fennici* **42**: 559–564.
- Cross HB, Zedrosser A, Nevin O, Rosell F. 2014.** Sex discrimination via anal gland secretion in a territorial monogamous mammal. *Ethology* **120**: 1044–1052.

- Dall SRX, Giraldeau LA, Olsson O, McNamara JM, Stephens DW. 2005. Information and its use by animals in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 187–193.
- Danchin É, Giraldeau LA, Cézilly F. 2005. *Ecologie Comportementale*. Paris: Dunod.
- Darwin CR. 1871. *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. London: John Murray.
- Ditchkoff SS, Lochmiller RL, Masters RE, Hoofer SR, Bussche RAVD. 2001. Major Histocompatibility Complex-associated variation in secondary sexual traits of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): evidence for good-genes advertisement. *Evolution* **55**: 616–625.
- Drea CM. 2007. Sex and seasonal differences in aggression and steroid secretion in *Lemur catta*: are socially dominant females hormonally ‘masculinized’? *Hormones and Behavior* **51**: 555–567.
- Drea CM, Boulet M, Delbarco-Trillo J, Greene LK, Sacha CR, Goodwin TE, Dubay GR. 2013. The “secret” in secretions: methodological considerations in deciphering primate olfactory communication. *American Journal of Primatology* **75**: 621–642.
- Drea CM, Vignieri SN, Kim HS, Weldele ML, Glickman SE. 2002. Responses to olfactory stimuli in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*): II. Discrimination of conspecific scent. *Journal of Comparative Psychology* **116**: 342–349.
- Dronnet S, Lohou C, Christides JP, Bagnères AG. 2006. Cuticular hydrocarbon composition reflects genetic relationship among colonies of the introduced termite *Reticulitermes santonensis* Feytaud. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 1027–1042.
- Eisenberg JF, Kleiman DG. 1972. Olfactory communication in mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* **3**: 1–32.
- Eisner T, Meinwald J. 2003. Alkaloid-derived pheromones and sexual selection in Lepidoptera. In: Blomquist GJ, Vogt RG, eds. *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology: the Biosynthesis and Detection of Insect Pheromones and Plant Volatiles*. New York: Academic Press, 251–269.
- Eizaguirre C, Yeates SE, Lenz TL, Kalbe M, Milinski M. 2009. MHC-based mate choice combines good genes and maintenance of MHC polymorphism. *Molecular Ecology* **18**: 3316–3329.
- Elgar MA. 1986. House sparrows establish foraging flocks by giving chirrup calls if the resources are divisible. *Animal Behaviour* **34**: 169–174.
- Eltz T, Sager A, Lunau K. 2005. Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. *Journal of Comparative Physiology A* **191**: 575–581.
- Emlen DJ. 2008. The evolution of animal weapons. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**: 387–413.
- Estrada C, Yildizhan S, Schulz S, Gilbert LE. 2010. Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 407–413.

- d’Ettorre P, Lenoir A. 2009. Nestmate Recognition. In: Lach L, Parr C, Abbott K, eds. *Ant Ecology*. Oxford: Oxford University Press, 194–209.
- Falcón T, Ferreira-Caliman MJ, Franco Nunes FM, Tanaka ED, do Nascimento FS, Gentile Bitondi MM. 2014. Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50: 68–81.
- Ferrandiz-Rovira M, Allainé D, Callait-Cardinal MP, Cohas A. 2016. Mate choice for neutral and MHC genetic characteristics in Alpine marmots: different targets in different contexts? *Ecology and Evolution* 6: 4243–4257.
- Fisher I. 1930. *The Theory of Interest*. New York: The Macmillan Co.
- Font E, Barbosa D, Sampedro C, Carazo P. 2012. Social behavior, chemical communication, and adult neurogenesis: studies of scent mark function in *Podarcis* wall lizards. *General and Comparative Endocrinology* 177: 9–17.
- Freeberg TM. 2006. Social complexity can drive vocal complexity: group size influences vocal information in Carolina chickadees. *Psychological Science* 17: 557–561.
- Freeberg TM, Dunbar RIM, Ord TJ. 2012a. Social complexity as a proximate and ultimate factor in communicative complexity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1785–1801.
- Freeberg TM, Ord TJ, Dunbar RIM. 2012b. The social network and communicative complexity: preface to theme issue. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1782–1784.
- Fromhage L, Kokko H, Reid JM. 2009. Evolution of mate choice for genome-wide heterozygosity. *Evolution* 63: 684–694.
- Gabirot M, Mardon J, Campagna S, West N, Bonadonna F, Saunders SM. 2016. Guidelines for collecting and extracting avian odors in a remote field: case study of a subantarctic seabird. In: Schulte BA, Goodwin TE, Ferkin MH, eds. *Chemical Signals in Vertebrate* 13. Switzerland: Springer, 435–460.
- Gerlach G, Lysiak N. 2006. Kin recognition and inbreeding avoidance in zebrafish, *Danio rerio*, is based on phenotype matching. *Animal Behaviour* 71: 1371–1377.
- Goossens B, Graziani L, Waits LP, Farand E, Magnolon S, Coulon J, Bel MC, Taberlet P, Allainé D. 1998. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43: 281–288.
- Gosling LM. 1982. A reassessment of the function of scent marking in territories. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 60: 89–118.
- Gosling LM, Roberts SC. 2001. Scent-marking by male mammals: cheat-proof signals to competitors and mates. *Advances in the Study of Behavior* 30: 169–217.
- Grafen A. 1990. Biological signals as handicaps. *Journal of Theoretical Biology* 144: 517–546.
- Greenwood PG. 2009. Acquisition and use of nematocysts by cnidarian predators. *Toxicon* 54: 1065–1070.

- Grether GF. 2010. The evolution of mate preferences, sensory biases, and indicator traits. *Advances in the Study of Behavior* **41**: 35–76.
- Hackländer K, Möstl E, Arnold W. 2003. Reproductive suppression in female Alpine marmots, *Marmota marmota*. *Animal Behaviour* **65**: 1133–1140.
- Hare JF, Sealy SG, Underwood TJ, Ellison KS, Stewart RL. 2003. Evidence of self-referent phenotype matching revisited: airing out the armpit effect. *Animal Cognition* **6**: 65–68.
- Harris RL, Holland BR, Cameron EZ, Davies NW, Nicol SC. 2014. Chemical signals in the echidna: differences between seasons, sexes, individuals and gland types. *Journal of Zoology* **293**: 171–180.
- Hasson O. 1994. Cheating signals. *Journal of Theoretical Biology* **167**: 223–238.
- Hauber ME, Lacey EA. 2005. Bateman's principle in cooperatively breeding vertebrates: the effects of non-breeding alloparents on variability in female and male reproductive success. *Integrative and Comparative Biology* **45**: 903–914.
- Heth G, Todrank J, Johnston RE. 1998. Kin recognition in golden hamsters: evidence for phenotype matching. *Animal Behaviour* **56**: 409–417.
- Hettyey A, Hegyi G, Puurtinen M, Hoi H, Török J, Penn DJ. 2010. Mate choice for genetic benefits: time to put the pieces together. *Ethology* **116**: 1–9.
- Heymann EW. 2006. The neglected sense—olfaction in primate behavior, ecology, and evolution. *American Journal of Primatology* **68**: 519–524.
- Hill GE, Farmer KL. 2005. Carotenoid-based plumage coloration predicts resistance to a novel parasite in the house finch. *Naturwissenschaften* **92**: 30–34.
- Hill GE, Montgomerie R. 1994. Plumage colour signals nutritional condition in the house finch. *Proceedings: Biological Sciences* **258**: 47–52.
- Hollén LI, Radford AN. 2009. The development of alarm call behaviour in mammals and birds. *Animal Behaviour* **78**: 791–800.
- Holmes WG. 1986. Identification of paternal half-siblings by captive Belding's ground squirrels. *Animal Behaviour* **34**: 321–327.
- Holmes WG. 2004. The early history of Hamiltonian-based research on kin recognition. *Annales Zoologici Fennici* **41**: 691–711.
- Holmes WG, Sherman PW. 1982. The ontogeny of kin recognition in two species of ground squirrels. *American Zoologist* **22**: 491–517.
- Hoogland JL. 1983. Nepotism and alarm calling in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Animal Behaviour* **31**: 472–479.
- Houck LD. 2009. Pheromone communication in amphibians and reptiles. *Annual Review of Physiology* **71**: 161–176.
- Hurst JL. 2009. Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural Brain Research* **200**: 295–303.
- Hurst JL, Beynon RJ. 2004. Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *BioEssays* **26**: 1288–1298.

- Hurst JL, Beynon RJ. 2013. Rodent urinary proteins: genetic identity signals and pheromones. In: East ML, Dehnhard M, eds. *Chemical Signals in Vertebrates 12*. New York: Springer, 117–133.
- Irwin AJ, Taylor PD. 2000. Heterozygous advantage and the evolution of female choice. *Evolutionary Ecology Research* 2: 119–128.
- Iwasa Y, Pomiankowski A, Nee S. 1991. The evolution of costly mate preferences II. The ‘handicap’ principle. *Evolution* 45: 1431–1442.
- Jackson DE, Châline N. 2007. Modulation of pheromone trail strength with food quality in Pharaoh’s ant, *Monomorium pharaonis*. *Animal Behaviour* 74: 463–470.
- Jackson DE, Ratnieks FLW. 2006. Communication in ants. *Current Biology* 16: R570–R574.
- Johansson BG, Jones TM. 2007. The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews* 82: 265–289.
- Johnson RP. 1973. Scent marking in mammals. *Animal Behaviour* 21: 521–535.
- Johnson K, Rosetta D, Burley N. 1993. Preferences of female American goldfinches (*Carduelis tristis*) for natural and artificial male traits. *Behavioral Ecology* 4: 138–143.
- Johnston RE. 2003. Chemical communication in rodents: from pheromones to individual recognition. *Journal of Mammalogy* 84: 1141–1162.
- Johnstone RA. 1995. Sexual selection, honest advertisement and the handicap principle: reviewing the evidence. *Biological Reviews* 70: 1–65.
- Juola FA, Dearborn DC. 2012. Sequence-based evidence for major histocompatibility complex-disassortative mating in a colonial seabird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 153–162.
- Kappeler PM. 2019. A framework for studying social complexity. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 73: 13.
- Kappeler PM, van Schaik CP. 2002. Evolution of primate social systems. *International Journal of Primatology* 23: 707–740.
- Kean EF, Müller CT, Chadwick EA. 2011. Otter scent signals age, sex, and reproductive status. *Chemical Senses* 36: 555–564.
- Kelliher KR. 2007. The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Hormones and Behavior* 52: 561–570.
- Knapp LA, Robson J, Waterhouse JS. 2006. Olfactory signals and the MHC: a review and a case study in *Lemur catta*. *American Journal of Primatology* 68: 568–584.
- Kokko H, Jennions MD, Brooks R. 2006. Unifying and testing models of sexual selection. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 43–66.
- Krams I, Krama T, Freeberg TM, Kullberg C, Lucas JR. 2012. Linking social complexity and vocal complexity: a parid perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1879–1891.
- Kruuk H, Gorman M, Leitch A. 1984. Scent-marking with the subcaudal gland by the European badger, *Meles meles* L. *Animal Behaviour* 32: 899–907.

- Kuhelj A, de Groot M, Pajk F, Simčič T, Virant-Doberlet M. 2015. Energetic cost of vibrational signalling in a leafhopper. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **69**: 815–828.
- Lacy RC, Sherman PW. 1983. Kin recognition by phenotype matching. *The American Naturalist* **121**: 489–512.
- Lamarck JB de M. 1809. *Phylosophie Zoologique*. Paris: Dentus, p.346.
- Lawson RE, Putnam RJ, Fielding AH. 2000. Individual signatures in scent gland secretions of Eurasian deer. *Journal of Zoology* **251**: 399–410.
- Leclaire S, van Dongen WFD, Voccia S, Merklings T, Ducamp C, Hatch SA, Blanchard P, Danchin E, Wagner RH. 2014. Preen secretions encode information on MHC similarity in certain sex-dyads in a monogamous seabird. *Scientific Reports* **4**: 6920.
- Leclaire S, Nielsen JF, Thavarajah NK, Manser M, Clutton-Brock TH. 2012. Odour-based kin discrimination in the cooperatively breeding meerkat. *Biology Letters* **9**: 20121054.
- Lehmann L, Keller LF, Kokko H. 2007. Mate choice evolution, dominance effects, and the maintenance of genetic variation. *Journal of Theoretical Biology* **244**: 282–295.
- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, Chandramani P, Maul-Pavicic A, Jäger M, Li XH, Breer H, Zufall F, Boehm T. 2004. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* **306**: 1033–1037.
- Lenoir A, D'Ettorre P, Errard C, Hefetz A. 2001. Chemical ecology and social parasitism in ants. *Annual Review of Entomology* **46**: 573–599.
- Lévy F, Keller M. 2008. Neurobiology of maternal behavior in sheep. *Advances in the Study of Behavior* **38**: 399–437.
- Lévy F, Keller M. 2009. Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behavioural Brain Research* **200**: 336–345.
- Lihoreau M, Rivault C, van Zweden JS. 2016. Kin discrimination increases with odor distance in the German cockroach. *Behavioral Ecology* **27**: 1694–1701.
- Linklater WL, Mayer K, Swaisgood RR. 2013. Chemical signals of age, sex and identity in black rhinoceros. *Animal Behaviour* **85**: 671–677.
- Liu D, Wei R, Zhang G, Yuan H, Wang Z, Sun L, Zhang J, Zhang H. 2008. Male panda (*Ailuropoda melanoleuca*) urine contains kinship information. *Science Bulletin* **53**: 2793–2800.
- Löfqvist J. 1976. Formic acid and saturated hydrocarbons as alarm pheromones for the ant *Formica rufa*. *Journal of Insect Physiology* **22**: 1331–1346.
- López P, Aragón P, Martín J. 2003. Responses of female lizards, *Lacerta monticola*, to males' chemical cues reflect their mating preference for older males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **55**: 73–79.
- MacDonald EA, Fernandez-duque E, Evans S, Hagey LR. 2008. Sex, age, and family differences in the chemical composition of owl monkey (*Aotus nancymae*) subcaudal scent secretions. *American Journal of Primatology* **70**: 12–18.

- Mahurin EJ, Freeberg TM. 2009.** Chick-a-dee call variation in Carolina chickadees and recruiting flockmates to food. *Behavioral Ecology* **20**: 111–116.
- Manser MB. 2001.** The acoustic structure of suricates' alarm calls varies with predator type and the level of response urgency. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **268**: 2315–2324.
- Manser MB, Bell MB, Fletcher LB. 2001.** The information that receivers extract from alarm calls in suricates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **268**: 2485–2491.
- Mardon J, Bonadonna F. 2009.** Atypical homing or self-odour avoidance? Blue petrels (*Halobaena caerulea*) are attracted to their mate's odour but avoid their own. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63**: 537–542.
- Mardon J, Saunders SM, Anderson MJ, Couchoux C, Bonadonna F. 2010.** Species, gender, and identity: cracking Petrels' sociochemical code. *Chemical Senses* **35**: 309–321.
- Marler P. 1977.** The evolution of communication. In: Sebeok TA, eds. *How animals communicate*. Bloomington: University Press, 45–70.
- Martín J, López P. 2010.** Condition-dependent pheromone signaling by male rock lizards: more oily scents are more attractive. *Chemical Senses* **35**: 253–262.
- Martin SJ, Vitikainen E, Shemilt S, Drijfhout FP, Sundström L. 2013.** Sources of variation in cuticular hydrocarbons in the ant *Formica exsecta*. *Journal of Chemical Ecology* **39**: 1415–1423.
- Martín-Vivaldi M, Peña A, Peralta-Sánchez JM, Sánchez L, Ananou S, Ruiz-Rodríguez M, Soler JJ. 2010.** Antimicrobial chemicals in hoopoe preen secretions are produced by symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 123–130.
- Mason RT, Parker MR. 2010.** Social behavior and pheromonal communication in reptiles. *Journal of Comparative Physiology A* **196**: 729–749.
- Mateo JM. 2003.** Kin recognition in ground squirrels and other rodents. *Journal of Mammalogy* **84**: 1163–1181.
- Mateo JM. 2009.** The causal role of odours in the development of recognition templates and social preferences. *Animal Behaviour* **77**: 115–121.
- Mateo JM, Johnston RE. 2003.** Kin recognition by self-referent phenotype matching: weighing the evidence. *Animal Cognition* **6**: 73–76.
- Maynard Smith J, Harper D. 2003.** *Animal signals*. Oxford: Oxford University Press.
- Mays HL, Albrecht T, Liu M, Hill GE. 2008.** Female choice for genetic complementarity in birds: a review. *Genetica* **134**: 147–158.
- Mays HL, Hill GE. 2004.** Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 554–559.
- McGregor PK, Peake TM. 2000.** Communication networks: social environments for receiving and signalling behaviour. *Acta Ethologica* **2**: 71–81.

- Merkx J, Slob AK, Van Der Werff Ten Bosch JJ. 1988. Vaginal bacterial flora partially determines sexual attractivity of female rats. *Physiology & Behavior* **44**: 147–149.
- Metzger M, Bernstein C, Hoffmeister TS, Desouhant E. 2010. Does kin recognition and sibling-mating avoidance limit the risk of genetic incompatibility in a parasitic wasp? *PLoS ONE* **5**: e13505.
- Milinski M. 2006. The Major Histocompatibility Complex, sexual selection, and mate choice. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **37**: 159–186.
- Mizuno K, Shinohara T, Noda M, Mizuno N. 2004. Mother-infant skin-to-skin contact after delivery results in early recognition of own mother's milk odour. *Acta Paediatrica* **93**: 1640–1645.
- Moser-Purdy C, Mennill DJ. 2016. Large vocal repertoires do not constrain the dear enemy effect: a playback experiment and comparative study of songbirds. *Animal Behaviour* **118**: 55–64.
- Mougeot F, Pérez-Rodríguez L, Martínez-Padilla J, Leckie F, Redpath SM. 2007. Parasites, testosterone and honest carotenoid-based signalling of health. *Functional Ecology* **21**: 886–898.
- Mucignat-Caretta C. 2010. The rodent accessory olfactory system. *Journal of Comparative Physiology A* **196**: 767–777.
- Müller-Schwarze D. 2006. *Chemical Ecology of Vertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F. 2009. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annual Review of Physiology* **71**: 115–140.
- Neff BD, Pitcher TE. 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology* **14**: 19–38.
- Neff BD, Pitcher TE. 2009. Mate choice for nonadditive genetic benefits and the maintenance of genetic diversity in song sparrows. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 424–429.
- Nieberding CM, de Vos H, Schneider MV, Lassance JM, Estramil N, Andersson J, Bång J, Hedenström E, Löfstedt C, Brakefield PM. 2008. The male sex pheromone of the butterfly *Bicyclus anynana*: towards an evolutionary analysis. *PLoS ONE* **3**: e2751.
- Nishida R. 2002. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* **47**: 57–92.
- Nordlund DA, Lewis WJ. 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology* **2**: 211–220.
- Notman H, Rendall D. 2005. Contextual variation in chimpanzee pant hoots and its implications for referential communication. *Animal Behaviour* **70**: 177–190.
- Novotny MV. 2003. Pheromones, binding proteins and receptor responses in rodents. *Biochemical Society Transactions* **31**: 117–122.

- Novotny M, Harvey S, Jemiolo B, Alberts J. 1985. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**: 2059–2061.
- Ord TJ, Garcia-Porta J. 2012. Is sociality required for the evolution of communicative complexity? Evidence weighed against alternative hypotheses in diverse taxonomic groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1811–1828.
- Owren MJ, Rendall D, Ryan MJ. 2010. Redefining animal signaling: influence versus information in communication. *Biology & Philosophy* **25**: 755–780.
- Palagi E. 2006. Beyond odor discrimination: demonstrating individual recognition by scent in *Lemur Catta*. *Chemical Senses* **31**: 437–443.
- Palphramand KL, White PCL. 2007. Badgers, *Meles meles*, discriminate between neighbour, alien and self scent. *Animal Behaviour* **74**: 429–436.
- Penn DJ. 2002. The scent of genetic compatibility: sexual selection and the Major Histocompatibility Complex. *Ethology* **108**: 1–21.
- Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK. 2002. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 11260–11264.
- Perrin C, Allainé D, Le Berre M. 1993. Socio-spatial organization and activity Distribution of the Alpine marmot *Marmota marmota*: preliminary results. *Ethology* **93**: 21–30.
- Phelan PL, Baker C. 1986. Male-size-related courtship success and intersexual selection in the tobacco moth, *Ephestia elutellal*. *Experientia* **42**: 1291–1293.
- Pollick AS, Gouzoules H, de Waal FBM. 2005. Audience effects on food calls in captive brown capuchin monkeys, *Cebus apella*. *Animal Behaviour* **70**: 1273–1281.
- Pomiankowski A. 1987. Sexual selection: the handicap principle does work - sometimes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **231**: 123–145.
- Puurtinen M, Ketola T, Kotiaho JS. 2009. The good-genes and compatible-genes benefits of mate choice. *The American Naturalist* **174**: 741–752.
- Ralls K. 1971. Mammalian scent marking. *Science* **171**: 443–449.
- Rasa OAE. 1973. Marking behaviour and its social significance in the African dwarf mongoose, *Helogale undulata rufula*. *Zeitschrift für Tierpsychologie* **32**: 293–318.
- Rasmussen LEL, Krishnamurthy V, Sukumar R. 2005. Behavioural and chemical confirmation of the preovulatory pheromone, (Z)-7-dodecenyl acetate, in wild Asian elephants: its relationship to musth. *Behaviour* **142**: 351–396.
- Rasmussen LEL, Lazar J, Greenwood DR. 2003. Olfactory adventures of elephantine pheromones. *Biochemical Society Transactions* **31**: 137–141.
- Rätti O, Hovi M, Lundberg A, Tegelström H. 1995. Extra-pair paternity and male characteristics in the pied flycatcher. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **37**: 419–425.

- Rausch RL, Bridgens JG. 1989. Structure and function of sudoriferous facia glands in Nearctic marmots, *Marmota spp.* (Rodentia: Sciuridae). *Zoologischer Anzeiger* **223**: 265–282.
- Reiczigel J, Lang Z, Rózsa L, Tóthmérész B. 2008. Measures of sociality: two different views of group size. *Animal Behaviour* **75**: 715–721.
- Rendall D, Owren MJ, Ryan MJ. 2009. What do animal signals mean? *Animal Behaviour* **78**: 233–240.
- Roberts SC. 2007. Scent marking. In: Wolff JO, Sherman PW, eds. *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective*. Chicago: The University of Chicago Press, 255–266.
- Roberts SA, Davidson AJ, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL. 2012. Pheromonal induction of spatial learning in mice. *Science* **338**: 1462–1465.
- Roberts SA, Simpson DM, Armstrong SD, Davidson AJ, Robertson DH, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL. 2010. Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biology* **8**: 75.
- Romeyer A, Porter RH, Poindron P, Orgeur P, Chesné P, Poulin N. 1993. Recognition of dizygotic and monozygotic twin lambs by ewes. *Behaviour* **127**: 119–138.
- Rosell F, Bjørkøyli T. 2002. A test of the dear enemy phenomenon in the Eurasian beaver. *Animal Behaviour* **63**: 1073–1078.
- Rosell F, Jojola SM, Ingdal K, Lassen BA, Swenson JE, Arnemo JM, Zedrosser A. 2011. Brown bears possess anal sacs and secretions may code for sex. *Journal of Zoology* **283**: 143–152.
- Roy L, Guilbert E, Bourgoïn T. 2007. Phylogenetic patterns of mimicry strategies in Darnini (Hemiptera: Membracidae). *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)* **43**: 273–288.
- Rubenstein DR, Abbot P. 2017. The evolution of social evolution. In: Rubenstein DR, Abbot P, eds. *Comparative Social Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1–18.
- Rubenstein DR, Abbot P. 2017. Social synthesis: opportunities for comparative social evolution. In: Rubenstein DR, Abbot P, eds. *Comparative social evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 427–452.
- Ruxton GD, Schaefer HM. 2011. Resolving current disagreements and ambiguities in the terminology of animal communication: definitions in animal communication. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 2574–2585.
- Schaal B, Coureaud G, Doucet S, Delaunay-El Allam M, Moncomble AS, Montigny D, Patris B, Holley A. 2009. Mammary olfactory signalisation in females and odor processing in neonates: ways evolved by rabbits and humans. *Behavioural Brain Research* **200**: 346–358.

- Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Sémon E, Perrier G. 2003. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* **424**: 68–72.
- Scordato ES, Dubay G, Drea CM. 2007. Chemical composition of scent marks in the ringtailed lemur (*Lemur catta*): glandular differences, seasonal variation, and individual signatures. *Chemical Senses* **32**: 493–504.
- Scott-Phillips TC. 2008. Defining biological communication. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 387–395.
- Setchell JM, Charpentier MJE, Abbott KM, Wickings EJ, Knapp LA. 2010a. Opposites attract: MHC-associated mate choice in a polygynous primate. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 136–148.
- Setchell JM, Vaglio S, Abbott KM, Moggi-Cecchi J, Boscaro F, Pieraccini G, Knapp LA. 2011. Odour signals major histocompatibility complex genotype in an Old World monkey. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**: 274–280.
- Setchell JM, Vaglio S, Moggi-Cecchi J, Boscaro F, Calamai L, Knapp LA. 2010b. Chemical composition of scent-gland secretions in an old world monkey (*Mandrillus sphinx*): influence of sex, male status, and individual identity. *Chemical Senses* **35**: 205–220.
- Shannon CE, Weaver W. 1949. *A Mathematical Model of Communication*. Urbana: University of Illinois Press.
- Sherman PW. 1977. Nepotism and the evolution of alarm calls. *Science* **197**: 1246–1253.
- Silk JB. 2007. The adaptive value of sociality in mammalian groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **362**: 539–559.
- Singer AG, Beauchamp GK, Yamazaki K. 1997. Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 2210–2214.
- Skelhorn J, Rowland HM, Ruxton GD. 2010. The evolution and ecology of masquerade. *Biological Journal of the Linnean Society* **99**: 1–8.
- Slade JWG, Watson MJ, Kelly TR, Gloor GB, Bernard MA, MacDougall-Shackleton EA. 2016. Chemical composition of preen wax reflects major histocompatibility complex similarity in songbirds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**: 20161966.
- Slessor KN, Winston ML, Le Conte Y. 2005. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology* **31**: 2731–2745.
- Smith TE, Tomlinson AJ, Mlotkiewicz JA, Abbott DH. 2001. Female marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) can be identified from the chemical composition of their scent marks. *Chemical Senses* **26**: 449–458.

- Spence-Aizenberg A, Kimball BA, Williams LE, Fernandez-Duque E. 2018. Chemical composition of glandular secretions from a pair-living monogamous primate: sex, age, and gland differences in captive and wild owl monkeys (*Aotus spp.*). *American Journal of Primatology* 80: e22730.
- Stoddard PK, Beecher MD, Horning CL, Willis MS. 1990. Strong neighbor-stranger discrimination in song sparrows. *The Condor* 92: 1051–1056.
- Strandh M, Westerdahl H, Pontarp M, Canback B, Dubois MP, Miquel C, Taberlet P, Bonadonna F. 2012. Major Histocompatibility Complex class II compatibility, but not class I, predicts mate choice in a bird with highly developed olfaction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 4457–4463.
- Sturgis SJ, Gordon DM. 2012. Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): a review. *Sturgis & Gordon* 2012 16: 101–110.
- Sun L, Müller-Schwarze D. 1998a. Anal gland secretion codes for relatedness in the beaver, *Castor canadensis*. *Ethology* 104: 917–927.
- Sun L, Müller-Schwarze D. 1998b. Anal gland secretion codes for family membership in the beaver. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 44: 199–208.
- Sundberg J. 1995. Female yellowhammers (*Emberiza citrinella*) prefer yellower males: a laboratory experiment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 37: 275–282.
- Symonds MRE, Johnson TL, Elgar MA. 2012. Pheromone production, male abundance, body size, and the evolution of elaborate antennae in moths. *Ecology and Evolution* 2: 227–246.
- Takken W. 1991. The role of olfaction in host-seeking of mosquitoes: a review. *Insect Science and Its Application* 12: 287–295.
- Templeton CN. 2005. Allometry of alarm calls: black-capped chickadees encode information about predator size. *Science* 308: 1934–1937.
- Thomas ML. 2011. Detection of female mating status using chemical signals and cues. *Biological Reviews* 86: 1–13.
- Till-Bottraud I, de Villemereuil P. 2016. Kin recognition or phenotype matching? *New Phytologist* 209: 13–14.
- Tinnesand HV, Jojola S, Zedrosser A, Rosell F. 2013. The smell of desperadoes? Beavers distinguish between dominant and subordinate intruders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67: 895–904.
- Todrank J, Heth G. 2003. Odor–genes covariance and genetic relatedness assessments: rethinking odor-based “recognition” mechanisms in rodents. *Advances in the Study of Behavior* 32: 77–130.
- Tregenza T, Wedell N. 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Molecular Ecology* 9: 1013–1027.

- delBarco-Trillo J, Burkert BA, Goodwin TE, Drea CM. 2011. Night and day: the comparative study of strepsirrhine primates reveals socioecological and phylogenetic patterns in olfactory signals. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 82–98.
- delBarco-Trillo J, Sacha CR, Dubay GR, Drea CM. 2012. Eulemur, me lemur: the evolution of scent-signal complexity in a primate clade. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1909–1922.
- Trivers RL. 1972. Parental investment and sexual selection. In: Campbell BG, eds. *Sexual Selection and the Descent of Man*. Chicago: Aldine, 136–207.
- Vaglio S. 2009. Chemical communication and mother-infant recognition. *Communicative & Integrative Biology* 2: 279–281.
- Vaglio S, Minicozzi P, Bonometti E, Mello G, Chiarelli B. 2009. Volatile signals during pregnancy: a possible chemical basis for mother–infant recognition. *Journal of Chemical Ecology* 35: 131–139.
- Vaglio S, Minicozzi P, Romoli R, Boscaro F, Pieraccini G, Moneti G, Moggi-Cecchi J. 2016. Sternal gland scent-marking signals sex, age, rank, and group identity in captive mandrills. *Chemical Senses* 41: 177–186.
- Vanpé C, Gaillard JM, Kjellander P, Liberg O, Delorme D, Hewison AJM. 2010. Assessing the intensity of sexual selection on male body mass and antler length in roe deer *Capreolus capreolus*: is bigger better in a weakly dimorphic species? *Oikos* 119: 1484–1492.
- Wcislo WT. 2005. Social labels: we should emphasize biology over terminology and not vice versa. *Annales Zoologici Fennici* 42: 565–568.
- Wierucka K, Pitcher BJ, Harcourt R, Charrier I. 2018. Multimodal mother–offspring recognition: the relative importance of sensory cues in a colonial mammal. *Animal Behaviour* 146: 135–142.
- Wyatt TD. 2010. Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A* 196: 685–700.
- Wyatt TD. 2014. *Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signatures*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Yamazaki K, Boyse EA, Miké V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA, Thomas L. 1976. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *Journal of Experimental Medicine* 144: 1324–1335.
- Zabarar R, Richardson BJ, Wyllie SG. 2005. Evolution in the suite of semiochemicals secreted by the sternal gland of Australian marsupials. *Australian Journal of Zoology* 53: 257–263.
- Zahavi A. 1975. Mate selection - a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* 53: 205–214.

- Zahavi A. 1977. The cost of honesty (further remarks on the handicap principle). *Journal of Theoretical Biology* **67**: 603–605.
- Zeh JA, Zeh DW. 1996. The evolution of polyandry I: Intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proceedings: Biological Sciences* **263**: 1711–1717.
- Zeh JA, Zeh DW. 1997. The evolution of polyandry II: Post-copulatory defences against genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **264**: 69–75.
- Zeh JA, Zeh DW. 2003. Toward a new sexual selection paradigm: polyandry, conflict and incompatibility. *Ethology* **109**: 929–950.
- Zhang JX, Liu D, Sun L, Wei R, Zhang G, Wu H, Zhang H, Zhao C. 2008. Potential chemosignals in the anogenital gland secretion of giant pandas, *Ailuropoda melanoleuca*, associated with sex and individual identity. *Journal of Chemical Ecology* **34**: 398–407.
- Zhang JX, Ni J, Ren XJ, Sun L, Zhang ZB, Wang ZW. 2003. Possible coding for recognition of sexes, individuals and species in anal gland volatiles of *Mustela eversmanni* and *M. sibirica*. *Chemical Senses* **28**: 381–388.
- Zhang YH, Zhang JX. 2011. Urine-derived key volatiles may signal genetic relatedness in male rats. *Chemical Senses* **36**: 125–135.
- Zidat T, Dell’Ariccia G, Gabirot M, Sourrouille P, Buatois B, Celerier A, Bonadonna F, Crochet PA. 2017. Reproductive isolation maintains distinct genotypes, phenotypes and chemical signatures in mixed colonies of the two European *Calonectris* shearwaters (Procellariiformes: Procellariidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **181**: 711–726.
- Ziegler A, Kentenich H, Uchanska-Ziegler B. 2005. Female choice and the MHC. *Trends in Immunology* **26**: 496–502.
- van Zweden JS, d’Ettorre P. 2010. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. In: Blomquist GJ, Bagnères AG, eds. *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, 222–243.

Chapitre 2

MATERIEL & METHODES

Chapitre 2

PARTIE I :

Modèle d'étude : la marmotte Alpine (*Marmota marmota*)



© Carole et Denis Favre-Bonvin

I. Le genre *Marmota* (Ordre: Rodentia, Famille: Sciuridae)

Les marmottes sont des rongeurs Sciuridés appartenant au genre *Marmota*. Le genre *Marmota* a une origine récente (Thomas & Martin, 1993) car la plus ancienne marmotte fossile connue (*M. minor*) date du Miocène² supérieur (Polly, 2003; Steppan *et al.*, 2011). Les marmottes sont d'abord apparues en Amérique du Nord (Brandler & Lyapunova, 2009; Erbajeva & Alexeeva, 2009) puis ont rejoint l'Eurasie à la fin du Pliocène² (Steppan *et al.*, 2011). Le genre *Marmota* comprend quinze espèces (Brandler & Lyapunova, 2009; Steppan *et al.*, 2011 ; **Fig.8**) qui ont toutes évoluées pendant le Pleistocène² (Black, 1972). Deux événements majeurs de spéciation ont été mis en évidence: un premier dans l'ouest de l'Amérique du Nord, formant le sous-genre *Petromarmota*, et un second en Asie centrale, formant le sous-genre *Marmota* (**Fig.8**; Armitage, 2014).

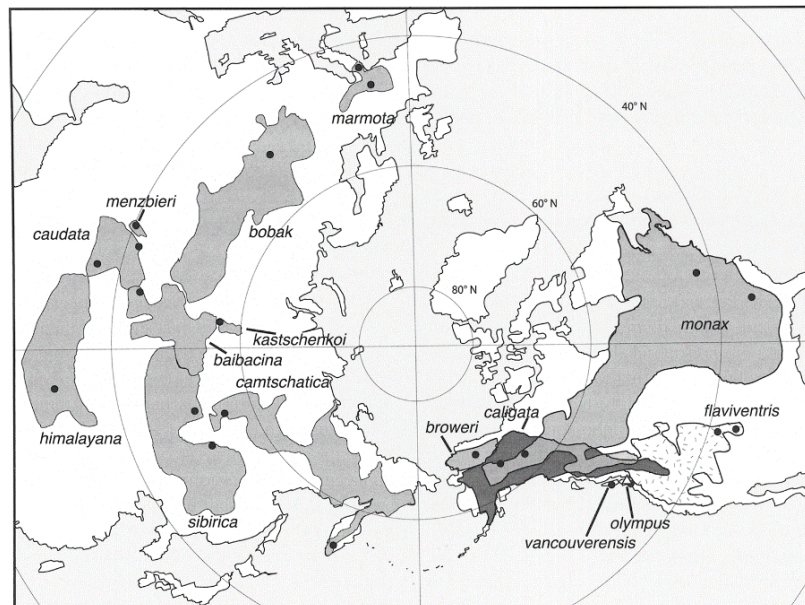


Figure 8 : Carte montrant la répartition actuelle des 15 espèces du genre *Marmota*, toutes restreintes à l'hémisphère Nord. Les pointillés (*M. flaviventris*) et le gris foncé (*M. caligata*) permettent de distinguer ces deux espèces qui ont des aires de répartitions qui se chevauchent. (vue polaire ; Steppan *et al.*, 2011).

² Miocène: environ de 23 à 5,5 Ma ; Pliocène: environ de 5,5 à 2,5 Ma ; Pleistocène: environ de 2,5 Ma à 11700 années (Wikipédia).

Le genre *Marmota* forme un groupe monophylétique à deux clades (Fig.9 ; (Kruckenhauser *et al.*, 1999; Steppan *et al.*, 1999; Brandler & Lyapunova, 2009), le sous-genre *Petromarmota* qui regroupe *M. flaviventris*, *M. olympus*, *M. caligata* et *M. vancouverensis*, et le sous-genre *Marmota* qui regroupe toutes les autres espèces. *Marmota monax* est la marmotte vivante la plus primitive (Brandler & Lyapunova, 2009).

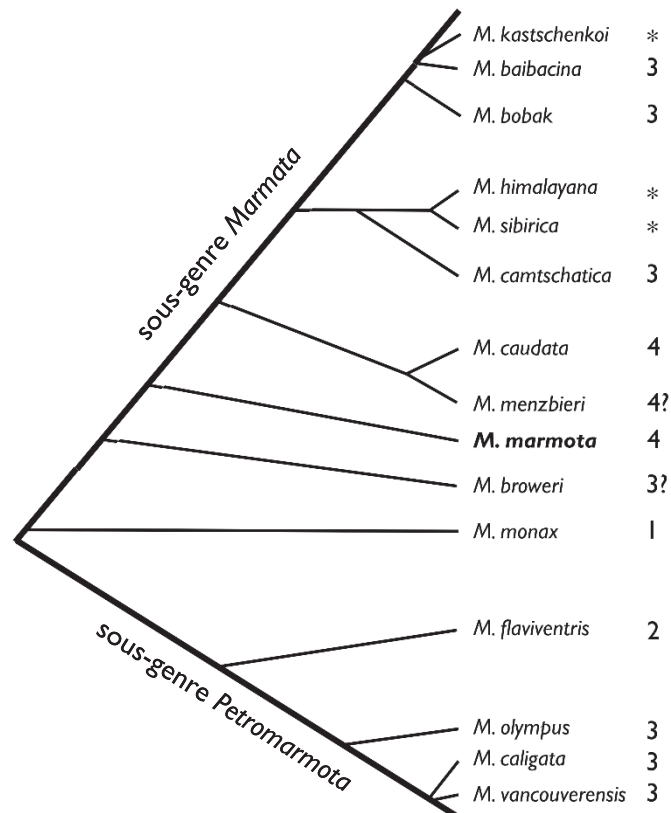


Figure 9 : Phylogénie du genre *Marmota*. Les deux axes principaux représentent les deux clades (*Marmota* et *Petromarmota*) et les lignes plus fines identifient les groupes d'espèces et leur position le long des axes principaux le temps relatif de diversification des espèces (adapté de Armitage, 2014). Les numéros correspondent au degré de socialité ; **1** : espèce solitaire, **2** : espèce sociale sans soins allo-parentaux aux jeunes, **3** : espèce sociale avec soins allo-parentaux aux jeunes, **4** : espèce à reproduction coopérative, et ***** : pas d'informations (Allainé, 2000; Berger, 2015).

La particularité du genre *Marmota* réside dans la grande diversité de ses niveaux de socialité, avec un gradient de socialité allant de *M. Monax* qui est une espèce solitaire jusqu'à la marmotte Alpine (*M. marmota*) qui est une espèce à reproduction coopérative (Fig.9).

II. La marmotte Alpine (*Marmota marmota* ; Linné 1758)

II.1. Généralités sur la marmotte Alpine

II.1.1. Répartition en France et en Europe

La répartition géographique naturelle de la marmotte Alpine comprend les Alpes, et les Carpates où une sous-espèce a été décrite (*M. marmota latirostris*). Entre 1948 et 1988, environ 400 marmottes Alpines ont été introduites avec succès dans les Pyrénées (López, Pino, & López, 2010), puis d'autres introductions ont eu lieu dans le Massif Central (France), la Forêt Noire (Allemagne) et les Apennins (Italie) (**Fig.10**). Les marmottes Alpines vivent généralement dans les prairies alpines et subalpines situées entre 1000 et 3000 m d'altitude (Allainé *et al.*, 1994; López *et al.*, 2010).

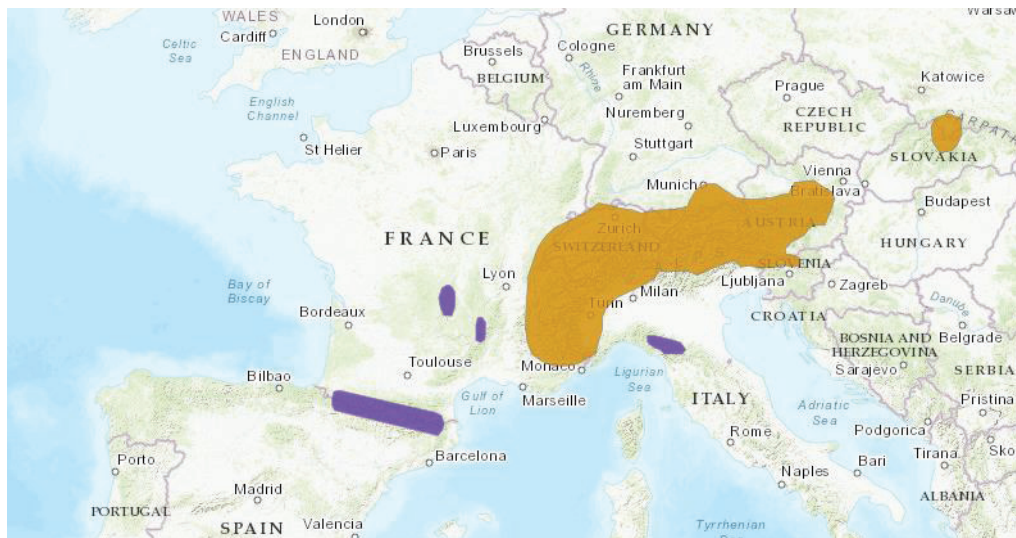


Figure 10 : Distribution actuelle de la marmotte Alpine. Les populations naturelles sont représentées en orange et les populations introduites en violet.
<http://www.iucnredlist.org>

II.1.2. Régime alimentaire

Les marmottes Alpines sont essentiellement herbivores (Bertolino, di Montezemolo, & Bassano, 2009) mais peuvent être parfois insectivores. Leur régime alimentaire est très diversifié et dépend de la saison, de la disponibilité alimentaire, mais aussi des besoins nutritionnels des individus (Rudatis & De Battisti, 2005). Des cas de carnivorie et / ou de cannibalisme ont également été signalés chez cette espèce, mais restent anecdotiques (Ferrari *et al.*, 2012; S.P., obs. pers.).

II.1.3. Morphologie

Chez cette espèce il n'y a pas de dimorphisme sexuel de taille et de coloration. La marmotte Alpine possède un pelage brun, un ventre beige à orangé, un museau brun, une petite zone blanche entre le nez et les yeux, de petites oreilles, des pattes relativement courtes et une queue touffue, brune à l'extrémité noire (**Fig.11**). Les marmottes grandissent jusqu'à l'âge de trois ans et, une fois adultes, atteignent une longueur tête-corps entre 45 et 68 cm. Leur masse corporelle varie fortement tout au long de l'année, avec un poids moyen de 2,2 kg pour les adultes à la sortie d'hibernation (mi-Avril) et de 6,5 kg à l'entrée en hibernation (mi-octobre) (Körtner & Heldmaier, 1995).



Figure 11 : Photographie d'une marmotte adulte. © Carole et Denis Favre-Bonvin

II.2. Organisation sociale

II.2.1. Organisation en groupes familiaux

Les marmottes Alpines vivent en groupe familiaux et sont territoriales. Un groupe social est généralement composé d'un couple de dominants, d'individus subordonnés des deux sexes (individus sexuellement matures non reproducteurs de 2 ans et plus, et individus immatures de 1 an), et des marmottons de l'année (Allainé *et al.*, 2000). La taille des groupes familiaux peut varier de 2 (le couple de dominants) à 20 individus (Allainé, 2000). Généralement, tous les individus composant une famille sont apparentés à au moins l'un des deux dominants (Perrin, Allainé, & Le Berre, 1993). L'ensemble des membres d'un groupe social partage un territoire composé d'un terrier principal, de terriers secondaires et de latrines. Chaque famille partage des frontières communes avec les familles voisines mais celles-ci varient assez peu d'une année à l'autre. Le terrier principal se compose de plusieurs pièces communicantes avec plusieurs sorties vers l'extérieur. Il est utilisé par le groupe familial pour dormir et hiberner, et c'est là que se fait la mise bas. Les terriers secondaires ne sont quant à eux que de petites cavités avec une seule sortie servant principalement de refuges contre les prédateurs qui sont l'aigle royal (*Aquila chrysaetos*) et le renard roux (*Vulpes vulpes*).

II.2.2. Structure sociale

Une fois la maturité sexuelle atteinte (2 ans), les subordonnés peuvent, soit rester subordonnés au sein du groupe natal et retarder leur reproduction, soit tenter d'acquérir le statut de dominance (et commencer à se reproduire) dans leur groupe natal ou dans un autre groupe en dispersant. Les femelles subordonnées obtiennent le statut de dominance à l'âge de $3,21 \pm 0,11$ ans en moyenne, tandis que pour les mâles c'est aux alentours de $3,50 \pm 0,11$ ans (Lardy *et al.*, 2012). Les individus des deux sexes peuvent rester dominants pendant plusieurs années, jusqu'à ce qu'ils soient expulsés par un autre individu (subordonné de la famille ou dispersant d'un autre groupe) et/ou qu'ils meurent (Lardy *et al.*, 2011).

Dans chaque groupe familial seul le couple de dominants se reproduit tandis que les subordonnés sexuellement matures subissent une suppression de reproduction. Celle-ci est physiologique et est provoquée par des comportements agressifs initiés par les dominants et dirigés vers les subordonnés de même sexes (Hackländer, Möstl, & Arnold, 2003). Cette agressivité provoque alors une augmentation des taux d'hormones de stress chez les subordonnés, ce qui conduit à une diminution des taux de testostérone chez les mâles et des taux de progestérone chez les femelles (Arnold & Dittami, 1997; Hackländer *et al.*, 2003). Cette suppression de reproduction est complète chez les femelles subordonnées mais est incomplète chez les subordonnés mâles qui peuvent ponctuellement accéder à la reproduction en cocufiant le mâle dominant (Goossens *et al.*, 1998; Cohas *et al.*, 2006).

Chez la marmotte Alpine les interactions entre individus sont fréquentes (Perrin *et al.*, 1993). Des interactions affiliatives sont observées entre tous les membres d'une même famille, bien qu'elles soient moins fréquentes avec le mâle dominant. A l'inverse, des interactions agonistiques se produisent entre les dominants d'un groupe familial et les individus étrangers (i.e. extérieur à la famille) qui pénètrent sur le territoire (**Article 3**), mais également au sein des groupes familiaux, entre les dominants et les subordonnées de même sexe (i.e. compétition intra-sexuelle ; **Article 1**).

II.2.3. Une espèce à reproduction coopérative

Les marmottes Alpines sont des « éleveurs coopératifs » (Blumstein & Armitage, 1999), c'est-à-dire qu'il y a un chevauchement des générations, un retard de dispersion et de reproduction chez les subordonnés, ainsi que des soins allo-parentaux (Jennions & Macdonald, 1994). En effet, les subordonnés des deux sexes participent fortement aux alertes anti-prédation, aux jeux de combat avec les jeunes et à l'entretien du terrier. De plus, les subordonnés mâles jouent un rôle central lors de l'hibernation en régulant la température du terrier principal, ils sont alors appelés « auxiliaires » (« *helpers* » en anglais ; Arnold, 1990, 1993a).

II.3. Cycle de vie

La marmotte Alpine a une durée de vie moyenne d'environ 7 ans mais les marmottes les plus vieilles observées dans la population que nous étudions avaient 16 ans. Les marmottes alpines atteignent la maturité sexuelle à l'âge de deux ans, âge auquel les subordonnés peuvent disperser. Cette période de dispersion débute juste après l'hibernation et se poursuit jusqu'au début de l'été. Pendant cette période, des interactions agressives entre les individus dispersant et les individus dominants de même sexe sont fréquentes. Ces rencontres agressives peuvent causer des blessures, pouvant engendrer de graves infections (voir la mort des individus) et par conséquent la perte du territoire. Les individus se retrouvant ainsi sans territoire, qu'ils soient subordonnés ou dominants, ont des taux de mortalité élevés (Stephens *et al.*, 2002; Lardy *et al.*, 2011). En effet, lorsque les mâles sexuellement matures dispersent, les seules issues possibles sont l'accès à la dominance ou la mort, car un individu ne peut redevenir subordonné dans un autre territoire.

II.3.1. Cycle biologique annuel

Le cycle biologique annuel de la marmotte Alpine peut se scinder en deux périodes: l'hibernation, qui a lieu de mi-October à mi-Avril, et la période d'activité qui a lieu l'autre moitié de l'année (**Fig.12**). Les marmottes se reproduisent deux ou trois semaines après la sortie de l'hibernation (Psenner, 1957) et les femelles ne sont réceptives que pendant une courte période. Après 30 jours de gestation les femelles mettent bas une unique portée allant de 1 à 7 marmottons (Hackländer & Arnold, 1999). Les marmottons restent alors 40 jours dans le terrier et sont entièrement dépendants de leur mère qui les allaite, puis les marmottons émergent du terrier une fois sevrés entre mi-Juin et mi-Juillet et pèsent alors environ 350 g (Allainé, Graziani, & Coulon, 1998). Après leur émergence ils commencent à se nourrir de plantes et à se familiariser avec l'environnement extérieur. Allainé (2004) a montré que chez la marmotte Alpine, le sexe-ratio des portées pouvait être biaisé en faveur des mâles lorsqu'il n'y a pas d'auxiliaires dans la famille, ce qui permet d'en avoir les années suivantes et d'augmenter la survie pendant l'hibernation. En revanche, les portées de femelles appartenant à des familles présentant des auxiliaires auraient tendance

à avoir un sexe-ratio non biaisé (Allainé, 2004). Le reste de la saison active est consacré, pour l'ensemble des marmottes, à la recherche de nourriture jusqu'à l'entrée en hibernation pour accumuler suffisamment de graisse pour survivre lors de l'hibernation, et assurer la reproduction l'année suivante (Körtner & Heldmaier, 1995).

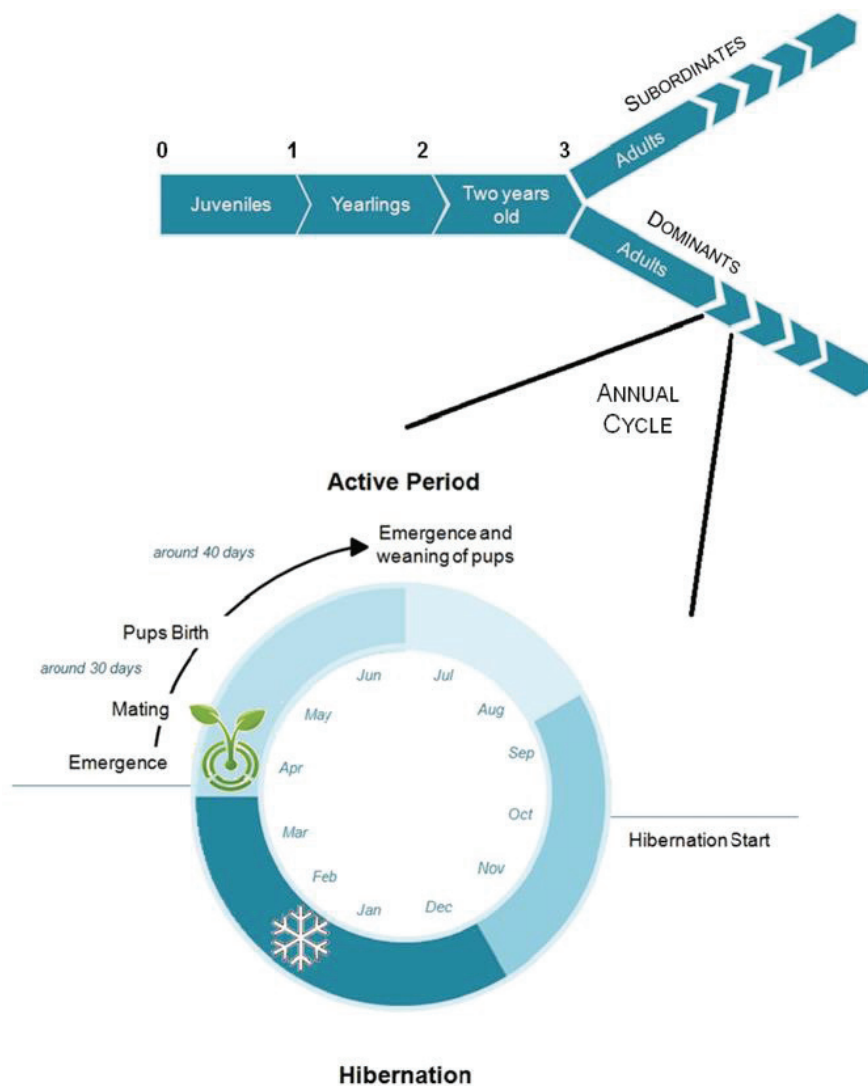


Figure 12 : Cycle de vie (A) et cycle de vie annuel (B) de la marmotte Alpine (Tafani et al., 2013).

II.3.2. L'hibernation et la thermorégulation sociale

Les conditions climatiques hivernales imposent d'importantes contraintes aux espèces vivant en milieu montagnard. Face à ces contraintes, la marmotte Alpine a développé une stratégie adaptative, l'hibernation sociale. Durant l'hibernation, l'ensemble des membres d'un groupe familial se rassemble dans une chambre du terrier principal appelé « *hibernaculum* » (Körtner & Heldmaier, 1995). L'hibernation est caractérisée par une succession de plusieurs épisodes de torpeur de durées variables, entrecoupées de phases euthermiques synchronisées (i.e. phases d'éveil, **Fig.13**). Pendant les phases euthermiques, la température corporelle est d'environ 38 °C (Arnold, 1988). Ces phases d'activité peuvent durer entre 24 et 50 heures, et bien qu'elles représentent moins de 10% de la durée de l'hibernation, elles sont responsables de 85% des dépenses énergétiques pendant cette période (Arnold *et al.*, 1991). A l'inverse, pendant les phases de torpeur, le métabolisme ralentit ce qui permet une réduction des besoins énergétiques, de préserver leurs fonctions vitales et d'augmenter la survie des individus pendant l'hiver (Humphries, Thomas, & Kramer, 2003). La température corporelle des individus diminue alors jusqu'à 5°C (Arnold, 1988).

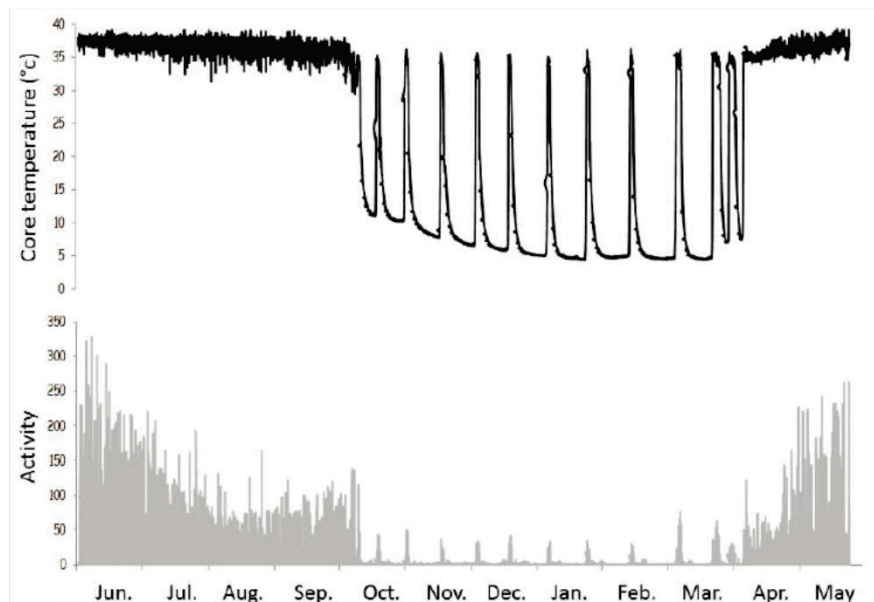


Figure 13 : Profil de température corporelle (en noire) et d'activité (en gris) d'un mâle adulte (fournie par Benjamin Rey).

Chez la marmotte Alpine les mâles subordonnés, qu'ils soient sexuellement matures ou immatures, sont considérés comme des auxiliaires pendant l'hibernation (Arnold, 1990, 1993b). En effet, ils contribuent activement à la production de chaleur dans l'*hibernaculum* familial lors de l'hibernation (thermorégulation sociale ; Arnold, 1993a). En effet, ces individus vont se réveiller plus tôt et avoir des phases de réveil synchrones et plus longues que les autres membres du groupe familial, ce qui permet de réchauffer l'*hibernaculum* (Arnold, 1993a). Cette thermorégulation sociale permet ainsi d'augmenter la probabilité de survie des marmottons, et celle-ci est fortement corrélée au nombre de subordonnés mâles présents dans le groupe familial au cours de leur première hibernation (Allainé *et al.*, 2000; Allainé & Theuriau, 2004 ; **Fig.14**). La thermorégulation sociale est cependant coûteuse pour les auxiliaires qui subissent une perte de masse corporelle plus importante que les autres membres du groupe social (Walter, 1990; Arnold, 1993a). L'investissement des auxiliaires dans la thermorégulation sociale s'ajuste en fonction de leur apparentement avec les marmottons. En effet, les subordonnés mâles qui hibernent avec leurs frères et sœurs perdent plus de poids que ceux qui ne sont pas apparentés avec les marmottons (Arnold, 1993b), ce qui implique une reconnaissance des apparentés. A l'inverse, la présence de femelles subordonnées a un impact négatif sur la survie des marmottons pendant l'hibernation car celles-ci entrent possiblement en concurrence avec les marmottons pour la chaleur (comme suggéré par Allainé & Theuriau, 2004).

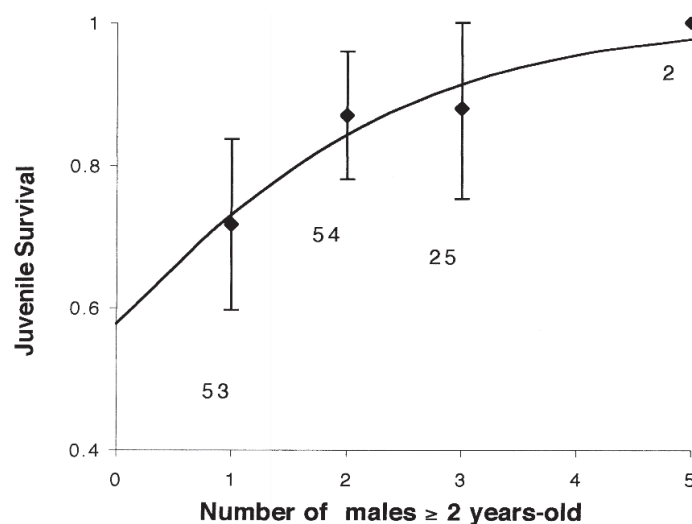


Figure 14 : Survie des marmottons en hiver en fonction du nombre d'auxiliaires présents dans le groupe familial pendant l'hibernation (Allainé & Theuriau, 2004).

II.3.3. La reproduction

La marmotte Alpine est une espèce socialement monogame et seul le couple de dominants monopolise la reproduction (Arnold & Dittami, 1997; Hackländer *et al.*, 2003). Les mâles dominants monopolisent généralement avec succès toute la reproduction, mais parfois il se produit des paternités hors-couple (EPP pour « *extra-pair paternity* » en anglais ; Goossens *et al.*, 1998; Cohas *et al.*, 2006). Le nombre d'EPP augmente avec le nombre de subordonnés mâles sexuellement matures (> 2 ans) présents dans le groupe familial (Cohas *et al.*, 2006, 2008; Lardy *et al.*, 2012). Il a alors été suggéré que le contrôle de nombreux subordonnés puisse être énergiquement coûteux pour les mâles dominants, ce qui les amènerait à perdre une partie de leur reproduction voir leur statut de dominance (Lardy *et al.*, 2012). Lorsque des EPP se produisent chez la marmotte Alpine, les marmottons au sein d'une même portée ont alors des pères différents. Dans notre population, 7.29% des marmottons sont issus d'une paternité hors-couple (EPY pour « *extra-pair young* » en anglais) et 13.79% des portées contiennent au moins un EPY (Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016).

La présence et le nombre de EPY augmentent lorsque les femelles dominantes sont associées à un partenaire social qui est génétiquement soit très similaire, soit très dissimilaire à elles (**Fig. 15A**, Cohas *et al.*, 2008; Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016), ou alors très similaire au CMH de classe II (**Fig. 15B**, Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). Ce cocufiage du mâle social peut alors être un moyen pour les femelles d'ajuster leur choix de partenaire lorsque le mâle social n'est pas optimal, en s'accouplant avec des mâles possédant des caractéristiques génétiques plus favorables pour la descendance. Généralement la femelle dominante cocufie son partenaire social soit avec un subordonné de la famille lorsque celui-ci n'est pas apparenté, soit avec un dispersant d'un autre territoire (Cohas *et al.*, 2006). Il a ainsi été suggéré que l'obtention d'avantages génétiques serait la principale force évolutive à l'origine des paternités hors-couple chez la marmotte Alpine (Cohas, Yoccoz, & Allainé, 2007b) car en effet, les EPP ont des conséquences sur la valeur sélective des descendants produits. Plus précisément, il a été constaté qu'au sein d'une même portée les EPY avaient un meilleur taux de survie et une probabilité plus grande d'accéder

au statut de dominance que les marmottons engendrés par le mâle social (Cohas *et al.*, 2007a).

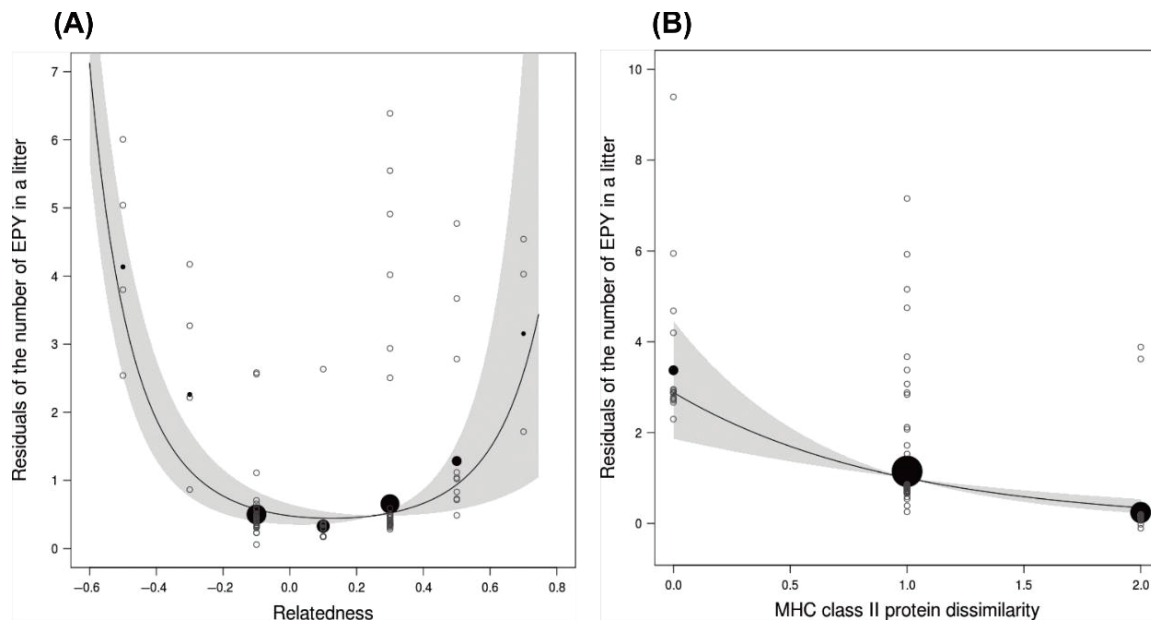


Figure 15 : Résidus du nombre d'EPY présents dans une portée en fonction de l'apparentement (A) et en fonction de la dissimilarité au CMH de classe II (B) entre le mâle dominant et la femelle dominante du groupe familial (Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016).

II.4. Communication

II.4.1. Communication visuelle

Chez la marmotte Alpine, la communication visuelle sert principalement à avertir d'un danger. En effet, lorsqu'elles aperçoivent un danger, les marmottes se redressent et regardent dans sa direction. Le plus souvent il s'agit d'un prédateur ou d'un intrus pénétrant sur le territoire. Les marmottes se mettent alors à suivre le danger du regard lorsqu'il se déplace puis se mettent à courir vers un de leurs terriers lorsque celui-ci s'approche (Perrin *et al.*, 1993). Ces deux comportements, posture de vigilance et retour au terrier en courant, servent à prévenir les autres membres du groupe de la présence du danger (Perrin *et al.*, 1993; Armitage, 2014). La communication visuelle intervient également lors des rencontres agonistiques. Les marmottes font alors des mouvements de tête et de queue particuliers (Armitage, 2014).

II.4.2. *Communication acoustique*

La surveillance du territoire est assurée par tous les membres de la famille. Lorsqu'un danger est détecté, les marmottes peuvent émettre des cris d'alarme pour prévenir les autres membres du groupe avant de se cacher dans leur terrier (Perrin *et al.*, 1993). Généralement un unique individu est à l'origine du cri, puis au fur et à mesure l'ensemble des individus (de la même famille et/ou des territoires voisins) vont également émettre des cris d'alarme de telle sorte à prévenir un grand nombre de congénères. Les cris d'alarme se composent généralement d'une seule note stéréotypée et modulée en fréquence (Perrin *et al.*, 1993).

II.4.3. *Communication chimique*

Les marmottes Alpines, comme toutes les espèces de marmottes, ont deux glandes jugales (également appelées glandes orbitales) situées de manière bilatérale entre l'œil et l'oreille, trois glandes anales, et deux glandes buccales situées au niveau des deux coins de la bouche. Ces trois glandes peuvent être utilisées pour communiquer (Rausch & Bridgens, 1989; Blumstein & Henderson, 1996).

La glande jugale est utilisée lors du marquage du territoire (Bel, Porteret, & Coulon, 1995; Bel *et al.*, 1999, **Article 3**). Cette glande exocrine est située dans le derme et son activité sécrétrice est fonction de l'âge. En effet, aucune sécrétion n'a été observée chez les jeunes marmottes (les individus de 1 an et les marmottons ; Bel *et al.*, 1999). Des études antérieures sur les marmottes Alpines ont montré que 1) le marquage du territoire se produit principalement entre la période de reproduction et l'émergence des marmottons (Bel *et al.*, 1995; Lenti Boero, 1995), 2) le marquage se concentre principalement au niveau des limites des territoires et au niveau des terriers principaux (Bel *et al.*, 1995; Lenti Boero, 1995), 3) bien que tous les individus matures possèdent cette glande, le marquage est principalement effectué par les dominants des deux sexes, bien que parfois les subordonnés sexuellement matures participent également au marquage (Bel *et al.*, 1995), et 4) les marquages odorant d'individus étrangers au groupe social sont généralement sur-marquées (« *over-marking* » en anglais ; Bel *et al.*, 1995).

Les marmottes Alpines ont également trois glandes anales qui peuvent être exhibées et sortir de l'anus, mais leur fonction est peu connue. Cette glande semble être impliquée lors de la compétition intra-sexuelle. En effet, lorsque des adultes de même sexe se rencontrent, qu'ils soient du même territoire ou de territoires voisins (rencontres aux limites de territoires), les individus se tournent autour en faisant des battements de queues et semblent exposer leurs glandes anales (D.A. obs. pers. ; **Article 1**). Ce comportement a également été décrit chez la marmotte à ventre jaune (*Marmota flaviventris*), lors d'interactions agressives entre mâles (Armitage, 2014).

Les glandes buccales restent les moins connues des trois types de glandes. Cependant, des observations comportementales suggèrent qu'elles puissent être impliquées lors des interactions sociales entre individus d'un même groupe familial (D.A. obs. pers.). En effet, il est courant d'observer des comportements amicaux entre individus d'une même famille caractérisés par des contacts museau contre museau (« *greeting behaviour* » en anglais, D.A. obs. pers.).

Chapitre 2

PARTIE 2 :

Site d'étude et suivi de la population



I. La réserve naturelle de la Grande Sassièr

Les données collectées au cours de ma thèse proviennent d'une population naturelle de marmottes Alpines située dans la réserve naturelle de La Grande Sassièr dans les Alpes françaises (**Fig.16**, 45 ° 29'N, 6 ° 59'E). Cette réserve naturelle est gérée par le parc national de la Vanoise dans la vallée de la Haute Tarentaise (Tignes, Savoie). L'altitude dans cette zone varie de 1850 à 3747 m. Les conditions météorologiques sont typiques d'un climat alpin caractérisé par une saisonnalité marquée, des températures moyennes basses, de fortes variations journalières et annuelles de température, et des précipitations assez fortes qui tombent principalement sous forme de neige. La végétation est fortement diversifiée et se compose de plantes alpines et sub-alpines, avec une grande quantité de fleurs de la fin du printemps jusqu'au début de l'été. La faune locale comprend de nombreuses espèces emblématiques des Alpes telles que le chamois Alpin (*Rupicapra rupicapra*), le bouquetin des Alpes (*Capra ibex*) et le gypaète barbu (*Gypaetus barbatus*), ainsi que les prédateurs de la marmotte alpine, le renard roux (*Vulpex vulpex*) et l'aigle royal (*Aquila chrysaetos*).



Figure 16 : Vue à 360° du site d'étude à la fin du printemps. © Maxime Gay

II. Les territoires suivis

La zone d'étude ne représente qu'une partie de la réserve naturelle de La Grande Sassièrre. Cette zone se situe sur la partie relativement basse de la réserve, à 2400 m d'altitude (45 ° 29'N, 6 ° 59'E). Tous les territoires (i.e. groupes familiaux) étudiés sont répartis sur une zone d'environ 1,5 km de long et de 500 m de large, situés approximativement à la même altitude, et sont orientés au nord ou au sud. De manière générale, l'exposition au soleil et la taille du domaine vital sont des indicateurs de la qualité du territoire des marmottes Alpines (Allainé *et al.*, 1994). En effet, la fonte des neiges sur les versants nord a tendance à se faire plus tard que sur les versants sud, ce qui entraîne un accès aux ressources alimentaires plus tardif au début de la période d'activité (Vuren & Armitage, 1991). De 1990 à 2018, 30 familles ont été suivies de manière intensive par un protocole de capture-marquage-recapture. Bien que les limites des territoires varient relativement peu d'une année à l'autre, une cartographie des territoires des groupes familiaux suivis est définie et actualisée chaque année (Fig.17).

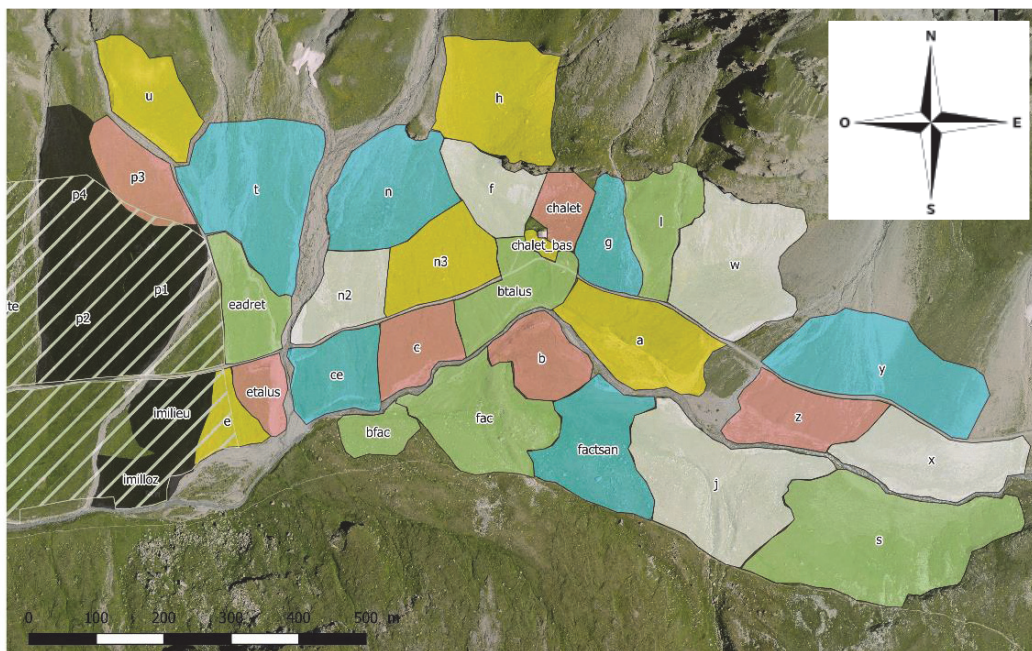


Figure 17 : Cartographie des territoires des groupes familiaux étudiés en 2016. Chaque couleur correspondant à la couleur des bagues plastiques des dominants de chaque territoire.

III. Capture des marmottes

La population est étudiée chaque année de mi-mai à mi-juillet au moyen d'un protocole de capture-marquage-recapture. Les individus sont capturés à l'aide de cages à deux portes appâtées avec du pissenlit (*Taraxacum densleonis*, **Fig.18**). Un à quatre pièges sont placés près de l'entrée des terriers principaux de chaque territoire afin d'attribuer facilement les individus capturés à leur groupe familial. Le groupe d'appartenance est également vérifié par observation.



Figure 18 : Capture d'une marmotte avec une cage à deux portes appâtée avec du pissenlit.

Pendant la période d'émergence des marmottons, une observation accrue de l'ensemble des territoires est déployée afin de déterminer la date d'émergence. Les marmottons sont ensuite comptés puis capturés à la main ou au moyen de petites cages à deux portes et ce, dans les trois jours après leur émergence. Ils sont enfin marqués par un transpondeur, et une barrette métallique placée à l'oreille droite pour les femelles et à l'oreille gauche pour les mâles afin de faciliter leur identification lors des observations comportementales.

IV. Manipulation des marmottes

Une fois capturées, les marmottes sont tranquilisées avec du Zolétil 100 ($0,1 \text{ mL.kg}^{-1}$) par injection intramusculaire. Les individus sont ensuite classés en classe d'âge (0, 1, 2 ou 3 ans et plus) sur la base de leur taille, puis pesés et sexés. Des caractéristiques morphologiques, comme la présence de testicules développées chez les mâles ou de mamelles développées chez les femelles, sont utilisées pour confirmer le statut de dominance préalablement déterminé par observations comportementales. Toutes les marmottes capturées pour la première fois sont marquées individuellement avec un transpondeur (modèle ID100, 0,9 cm de long, $< 0,1 \text{ cm}$ de diamètre, Trovan Ltd, www.Trovan.com, Identifikationssysteme, Metternicher Straße 4, 53919 Weilerswist, Allemagne) injecté sous la peau du cou pour une reconnaissance individuelle permanente, et avec une barrette métallique numérotée (1 cm x 3 mm) à l'oreille pour l'identification visuelle du sexe. Ces barrettes sont placées du côté droit pour les femelles et du côté gauche pour les mâles. Les individus dominants ont en plus une barrette en plastique de couleur placée sur l'oreille opposée (Fig.19).



Figure 19 : Photographie d'une marmotte Alpine femelle (barrette métallique à sa droite) dominante (barrette en plastique à l'oreille opposée) appartenant au territoire « etalus » (barrette en plastique de couleur rose). © Amélie Héraud

Des manipulations supplémentaires sont effectuées telles que des mesures morphologiques (e.g. longueur du tibia, longueur du corps sans la queue, longueur de la mandibule), une biopsie cutanée, ainsi qu'un prélèvement d'échantillon de poils et de sang pour des analyses génétiques. Des échantillons de matières fécales sont également prélevés immédiatement après la capture des individus pour réaliser des analyses parasitologiques. De plus, en 2016 et 2017 des prélèvements de sécrétions de glandes anales, jugales et buccales ont été réalisés à l'aide d'un protocole particulier (détaillé en Partie III) afin de les analyser chimiquement.

V. Observations comportementales

Des observations comportementales sont également effectuées quotidiennement pendant toute la saison du terrain afin de déterminer la taille et la composition de chaque groupe familial. Pour chaque groupe, la composition en classe d'âge (marmottons, individus de 1, 2, et 3 ans et plus) et en sexe est déterminée grâce aux baguettes auriculaires, à l'aide de jumelles 10 x 50 et de longues-vues 20 x 60. De plus, la morphologie, les comportements de marquage ainsi que les interactions antagonistes nous permettent de classer les individus selon leur statut social (i.e. subordonné ou dominant ; Bel et al. 1999). Ces observations sont toujours effectuées en dehors du territoire focal et à une distance de 80 à 200 m pour éviter tout dérangement des marmottes observées.

Chapitre 2

PARTIE 3 :

Collecte des sécrétions odorantes et analyse en Chromatographie en phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse (GCMS)



Photographie personnelle

I. Prélèvement et préservation des échantillons

Une fois la marmotte capturée et anesthésiée, les sécrétions des trois types de glandes (anales, jugales et buccales) peuvent être prélevées et un protocole spécifique est appliqué pour chacune des glandes. La manipulation de la marmotte se fait à l'aide de gants en nitrile afin d'éviter toute contamination des échantillons de sécrétions odorantes par des composés exogènes. Les gants en nitrile sont privilégiés par rapport aux gants en latex car ils n'émettent aucun composé chimique. Ensuite chacune des glandes est nettoyée à l'éthanol pour retirer tout contaminant provenant de l'environnement. Le prélèvement des sécrétions se fait après évaporation complète de l'éthanol. Pour collecter les sécrétions des glandes anales nous avons pressé doucement la zone autour des glandes de sorte à faire ressortir les trois papilles (**Fig.20**), et jusqu'à ce qu'une petite quantité de sécrétion soit libérée. La sécrétion des glandes anales est cireuse et blanchâtre, et a été prélevée à l'aide d'un capillaire en verre de 50 μL . Pour les sécrétions des glandes jugales et buccales qui sont liquides, nous avons utilisé des capillaires en verre de 5 μL afin de collecter les sécrétions par capillarité. Pour le prélèvement des sécrétions des glandes jugales il est nécessaire de raser la zone de prélèvement avant le nettoyage à l'éthanol, afin de diminuer le risque de contamination.



Figure 20 : Photographie des glandes anales d'une marmotte Alpine après la manipulation.

© Marionna Ferrandiz-Rovia

Les sources potentielles de contamination des échantillons étant nombreuses au moment du prélèvement, nous avons également collecté des échantillons dits « contrôles ». Ces « contrôles » sont collectés de la même manière que les échantillons de sécrétions odorantes à l'exception que les capillaires placés dans les vials sont dépourvus de sécrétion. Ces « contrôles » vont par la suite nous permettre de détecter les composés exogènes aux sécrétions de marmottes qui seraient quand même présents dans les échantillons. Grâce à ces « contrôles » nous avons pu repérer 3 composés exogènes retrouvés à la fois dans tous les échantillons « contrôles » et dans tous les échantillons de sécrétions de marmottes. Ces composés ont donc été considérés comme des contaminants et retirés des analyses.

Les échantillons ont ensuite été placés dans des vials de chromatographie de 1.5 mL en y mettant directement les capillaires utilisés pour les prélèvements. Les vials utilisés étaient brun afin de limiter la dégradation des composés chimiques par la lumière et avaient été préalablement remplis avec 200 μ L de dichlorométhane (HiPerSolv CHROMANORM for HPLC; VWR, Center Valley, PA, USA) dans lesquels nous avons ajouté un standard interne, le biphenyl (poids moléculaire : 154.21 g mol^{-1} , 99.5%; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), à une concentration de 0.2 g L^{-1} . Les vials ont ensuite été sellés par un bouchon tapissé d'une membrane en Teflon® (Burger 2005, delBarco-Trillo et al. 2011) et conservés à -20°C sur le terrain puis à -80°C au laboratoire jusqu'à ce que les analyses chimiques soient réalisées. Juste après le retour du terrain, l'ensemble des échantillons a été transféré dans des inserts de 0.3 mL, eux-même placés dans de nouveaux vials. Les analyses ont ensuite été réalisées dans les 6 mois afin d'éviter tout risque de dégradation des échantillons bien qu'ils soient conservés à l'obscurité et à -80 °C (**Encadré A**).

Encadré A : Préservation des échantillons

Afin d'optimiser la conservation des échantillons de sécrétions odorantes, il est important de les placer à des températures constantes et très froides (-80°C). L'application de telles températures va limiter la dégradation des échantillons et donc la perte de composés. En effet, une conservation à -80°C permet de limiter l'évaporation des composés les plus volatiles mais également la dégradation par fermentation bactérienne que pourrait provoquer les bactéries présentes dans les sécrétions odorantes. Scordado et ses collaborateurs ont mis en évidence qu'une conservation à -80°C , même pendant plusieurs années, ne modifiait pas la richesse spécifique des sécrétions odorantes de maki catta (*Lemur catta* ; Scordado et al. 2007), et permettait de conserver des odeurs qui n'atténuaient pas les réponses comportementales des animaux lorsque celles-ci étaient utilisées pour réaliser des expériences comportementales (Scordado & Drea 2007).

II. Préparation des échantillons

II.1. Extraction au solvant

Parmi les différentes techniques d'analyse chimique possibles nous avons fait le choix d'une extraction au solvant qui consiste en la dissolution des composés chimiques présents dans les sécrétions odorantes dans le solvant, ici du dichlorométhane. Les propriétés du solvant choisi, comme par exemple sa polarité ou sa volatilité, influencent les types de composés qu'il est possible de recueillir. Par conséquent, le choix du solvant détermine les composés chimiques pouvant être analysés par la suite. Nous avons décidé d'utiliser du dichlorométhane car c'est un solvant intermédiaire (ni polaire ni apolaire) qui a donc un fort pouvoir solubilisant pour plusieurs molécules, ce qui permet d'obtenir un large panel de molécules. De plus, il est très largement utilisé comme solvant lors d'analyses en GCMS de sécrétion de glandes odorantes chez les mammifères (e.g. Zhang *et al.*, 2007, 2008; Ponmanickam *et al.*, 2010; Liu, Huang, & Zhang, 2011; Achiraman *et al.*, 2011).

II.2 Standard interne

Généralement, lorsque cela est possible, un standard interne est ajouté au solvant. Le standard interne joue un rôle clé dans ce type de procédures analytiques car il va fournir un point de référence permettant d'aligner correctement l'ensemble des chromatogrammes et donc d'avoir une affectation précise des différents composés d'un individu à l'autre. En effet, il peut y avoir une dérive des instruments au cours du temps provoquant ainsi un décalage des temps de rétention des composés et donc un problème d'identification de ces derniers. Le standard interne doit être choisi avec soin car il ne doit pas réagir ou co-éluer³ avec les composés chimiques présents dans les sécrétions, et ne doit pas être produit de manière endogène par les marmottes Alpines. Par conséquent, nous nous sommes tournés vers le biphenyl qui est un composé chimique industriel (i.e. non synthétisé par les organismes vivants) et qui présente un spectre de masse bien distinctif. De plus, nous savons que ce composé ne co-élue pas avec les composés chimiques présents dans les sécrétions des marmottes. Nous avons en effet réalisé de nombreux essais pour chacune des glandes, sur des mélanges de 10 μL de chacun des échantillons récoltés en 2015, pour lesquels aucun standard interne n'avait été rajouté. Nous avons donc pu trouver sur ces chromatogrammes « bilan », une zone dépourvue de composés chimiques aux alentours de 10 minutes (**Fig.21**) et réaliser des essais pour trouver la concentration de standard interne à rajouter au solvant.

³ Signifie que si le standard interne a un temps de rétention identique ou proche de celui d'un composé présent dans l'échantillon, il va co-éluer avec ce dernier, c'est-à-dire sortir en un seul et unique pic ce qui faussera les analyses.

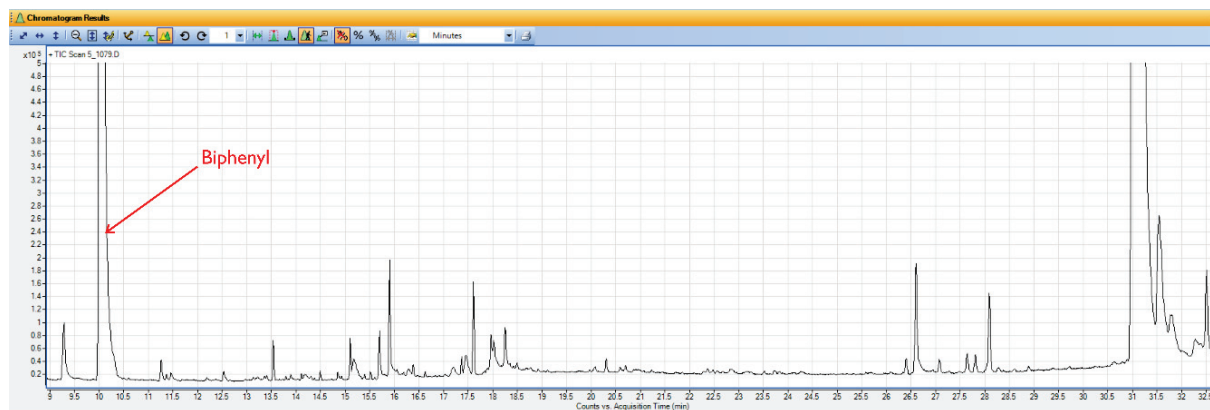


Figure 21 : Chromatogramme d'un échantillon de sécrétion de glande anale.

III. Analyse en GCMS

III.1. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est le « gold standard » de l'analyse chimique car c'est la méthode la plus fiable pour séparer les composés chimiques volatiles présents dans la plupart des sécrétions animales (Drea *et al.*, 2013). Le principe de la chromatographie en phase gazeuse consiste à vaporiser les composés dans un gaz inerte, c'est la « phase mobile », et à les faire passer à travers une colonne tapissée d'un substrat spécifique, la « phase stationnaire ». Nous avons choisi d'utiliser l'hélium qui est le gaz le plus souvent utilisé, ainsi qu'une colonne DB-5 MS qui est une colonne apolaire de 30m de long pouvant supporter des températures jusqu'à 325/350°C. Le choix de la colonne est très important. En effet, le substrat dont elle est composée ainsi que sa longueur sont des facteurs à prendre en considération pour optimiser la séparation des composés chimiques des sécrétions odorantes (Drea *et al.*, 2013). L'échantillon, une fois prélevé par la seringue d'injection de la GC, est injecté dans la colonne au niveau du port d'injection qui est généralement à une température assez élevée permettant la vaporisation des composés chimiques présents dans l'échantillon. Les composés chimiques sont ensuite portés par le courant d'hélium et entraînés dans la colonne suivant un programme de température précis. En fonction de l'affinité des composés chimiques volatilisés avec le substrat de la colonne, les composés quittent la colonne en fin de la séquence d'analyse à différents temps de rétention et sont ensuite détectés par le spectromètre de masse (Albone, 1984).

Le temps de rétention des composés dépend également de leur poids moléculaire (g.mol^{-1}). Les composés plus légers (i.e. avec un faible poids moléculaire) sortiront à des temps de rétention plus petit car la température nécessaire à leur volatilisation sera plus faible, tandis que les composés chimiques plus lourds (i.e. avec un poids moléculaire élevé) sortiront en fin de séquence à des temps de rétention plus élevés.

Après avoir choisi une colonne appropriée, plusieurs autres paramètres peuvent être optimisés pour augmenter l'efficacité d'élution des composés, réduire la co-élution entre les composés et ainsi produire des chromatogrammes avec les composés chimiques bien séparés. En effet, le débit du courant d'hélium, la température d'injection et le programme de température appliqué lors de la séquence d'analyse peuvent être optimisés. De nombreux essais coûteux en temps ont été réalisés en modifiant à la fois le débit d'hélium, la température d'injection et le programme de température appliqué afin de trouver la combinaison optimale de ces paramètres. Nous avons choisi d'utiliser un débit d'hélium de 1 mL.min^{-1} et une température d'injection à 300°C . Pour trouver le programme de température optimal, c'est-à-dire le programme qui sépare au mieux l'ensemble des composés chimiques tout en optimisant le temps de la séquence d'analyse, nous avons commencé par appliquer un programme de température débutant à 50°C pendant 3 minutes puis avec une augmentation progressive de la température de $+5^\circ\text{C/min}$. Ce programme de température nous a permis de bien séparer l'ensemble des composés chimiques et de voir où il était possible de « gagner » du temps (i.e. repérer les zones dépourvues de composés et les zones où les écarts entre les composés chimiques pouvaient être optimisés). Après plusieurs tentatives, nous avons trouvé le programme qui permettait une bonne séparation des composés chimiques en un temps relativement raisonnable. Le programme de température débute à 90°C pendant 4 minutes, puis augmente de $+12^\circ\text{C/min}$ jusqu'à 210°C , puis de $+5^\circ\text{C/min}$ jusqu'à 310°C , pour finir par une stabilisation à 310°C pendant 5 minutes. Une séquence optimisée dure donc 39 minutes, ce qui reste néanmoins assez long car lors de ma thèse j'ai eu près de 500 échantillons à analyser, ce qui représente plusieurs mois d'analyse en GCMS.

Parmi ces échantillons se trouvaient également des échantillons dits « blancs ». Ces « blancs » à l'inverse des « contrôles » étaient des vials uniquement remplis de dichlorométhane. Ces « blancs » permettaient de contrôler l'accumulation des composés qui pouvait se faire dans la colonne au fil des séquences d'analyses. En effet, ces composés accumulés pouvaient fausser les analyses, soit en créant artificiellement un nouveau composé, soit en biaisant la quantité de composés retrouvés dans les échantillons. Pour contrôler cela nous avons donc analysé des séquences de 7 échantillons en réalisant un « blanc » en début de séquence afin de vérifier la propreté de la colonne, et en fin de séquence pour contrôler cette accumulation potentielle de composés. Par la suite nous avons pu calculer les moyennes des composés retrouvés dans les blancs et les soustraire aux échantillons analysés pendant cette séquence. La plupart du temps presque qu'aucun composé n'étaient retrouvés dans les « blancs ».

III.2. Spectrométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse est généralement couplée à un spectromètre de masse avec ionisation électronique pour permettre l'identification des composés chimiques. Une fois les composés chimiques sortis de la colonne, ils sont détectés par le spectromètre de masse puis bombardés par un faisceau d'électrons. Lors de leur rencontre avec les électrons, les molécules chimiques sont cassées en fragments de différentes tailles. Si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, alors un électron du faisceau électronique va pouvoir arracher un électron de la molécule chimique, créant un cation radicalaire M^+ . Chaque molécule d'un même composé chimique pouvant être bombardée à des endroits différents, il en résulte un ensemble de nombreux fragments de différentes tailles appelé spectre de masse. Ce spectre de masse est alors propre à chaque composé chimique ce qui va permettre ensuite leur identification.

Le couplage d'une chromatographie en phase gazeuse avec un spectromètre de masse permet alors d'obtenir des chromatogrammes, où chaque pic représente un composé particulier défini par son temps de rétention et par son spectre de masse (**Fig.22**). La taille des pics représente alors la quantité de composé présent dans l'échantillon.

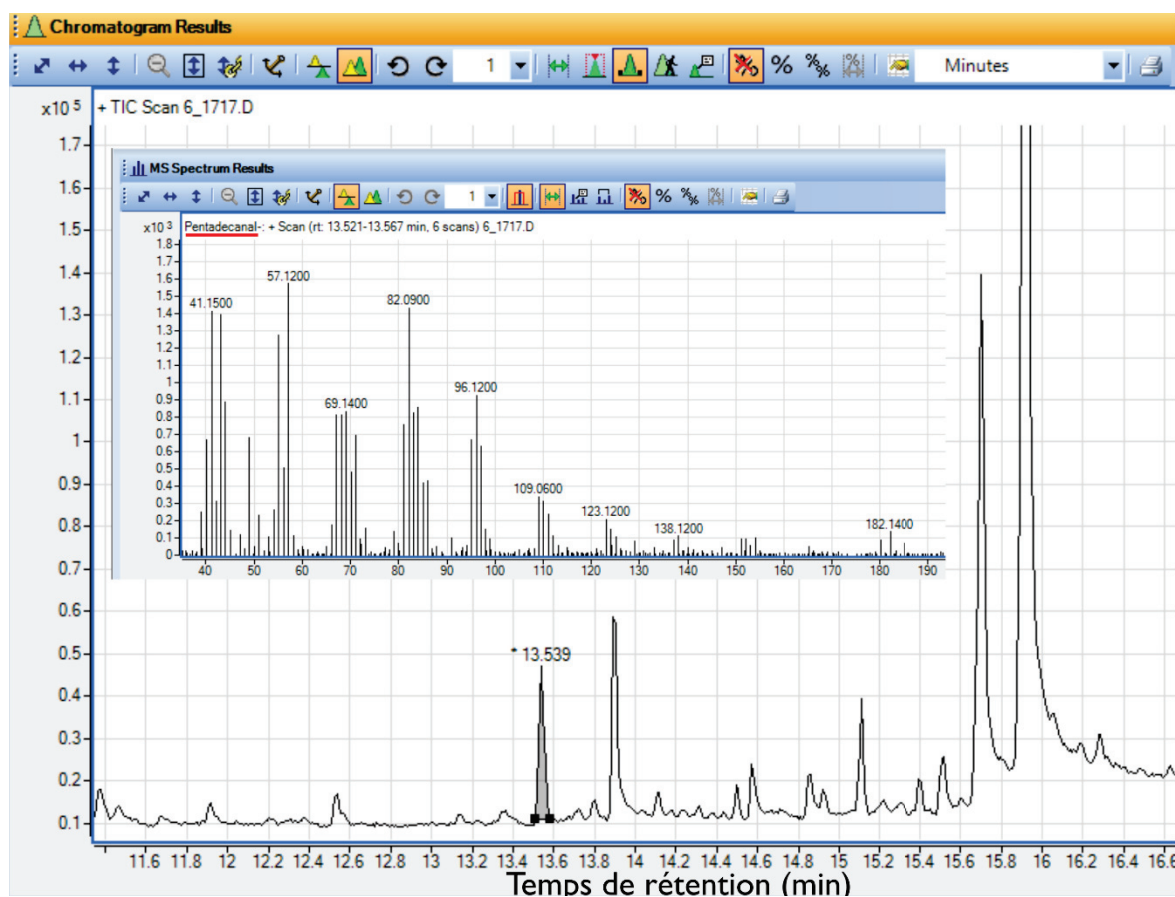


Figure 22 : Portion d'un chromatogramme d'un échantillon de sécrétion de glande anale. Le composé sélectionné est le pentadecanal que l'on peut identifier grâce à son spectre de masse.

III.3. Traitement des données de GCMS

III.3.1. Etapes de prétraitement

Le traitement de ce type de données implique plusieurs étapes : 1) la détection des pics, 2) la caractérisation et l'élimination du bruit de fond, 3) l'intégration des pics, et 4) l'identification qualitative des composés d'intérêt. De plus, lorsque l'on travaille avec plusieurs échantillons il est indispensable de vérifier l'alignement des chromatogrammes afin qu'il y ait une bonne correspondance entre un même composé d'un échantillon à l'autre. En effet, une dérive de l'appareillage peut survenir à mesure que les séquences d'analyse se font ce qui peut provoquer un décalage des temps de rétention des composés chimiques. Dans cette étape le standard interne est particulièrement utile car il est facilement repérable sur l'ensemble des chromatogrammes et permet donc d'estimer cette dérive.

Ces étapes prennent énormément de temps, surtout si elles sont réalisées manuellement. Par exemple, Dixon *et al.* (2006) ont estimé que le traitement manuel d'un jeu de données de 50 chromatogrammes comprenant 30 pics prenait environ 125 heures, soit environ trois semaines de travail. Même si la plupart des logiciels de GCMS contiennent des outils qui peuvent faciliter la réalisation de ces étapes, les erreurs et les imprécisions sont nombreuses et il est très souvent nécessaire d'intervenir manuellement sur les intégrations imparfaites. Ces logiciels permettent également de construire des bibliothèques de composés d'intérêt à partir d'un ou plusieurs échantillons, ce qui est très utile pour identifier un même composé d'un chromatogramme à l'autre grâce à son spectre de masse. Mais là encore des erreurs peuvent être faites, notamment lorsque des composés présentant des temps de rétention proches co-éluent. Dans ce cas, il faut réaliser l'intégration manuellement. De plus, cette bibliothèque est pratique principalement lorsque l'on a une série de composés cibles que l'on veut retrouver dans l'ensemble des chromatogrammes, mais dans le cas où chaque composé est important, cette bibliothèque ne sera complète uniquement lorsque tous les échantillons auront été analysés afin de pouvoir y entrer l'ensemble des composés d'intérêts.

III.3.2. Identification des composés

Les composés d'intérêt ont ensuite été identifiés à l'aide de leur indice de rétention de Kovats (RI) et de leur spectre de masse obtenu avec le logiciel Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (B.07.01 version). Les RI ont été calculés au moyen d'un mélange de n-alcanes (de C₇ à C₄₀ ; Supelco; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA; 1000 µg mL⁻¹ dilué à 1:100 dans de l'hexane) avec des RIs connus, analysé en GCMS avec le même programme que celui utilisé pour les échantillons. Ceci nous a permis d'obtenir les temps de rétention associés à chacun des alcanes et de calculer les RIs théoriques des composés d'intérêt présents dans les échantillons. Pour identifier les composés d'intérêt, le spectre de masse est la principale source d'information. Sur le spectre de masse, chaque pic représente un fragment de la molécule d'intérêt et ces fragments dérivent de l'ion moléculaire (ou « ion parent »). L'ion moléculaire n'est autre que la molécule dans son intégralité qui est donc passée à travers le bombardement d'électrons. Cet ion moléculaire fournit donc la masse moléculaire du composé, ce qui est très utile pour son identification. Cependant, l'ion moléculaire étant rarement présent et pouvant être identique pour deux composés différents (i.e. un même poids moléculaire mais une structure différente comme par exemple le pentadecanal et l'acide (Z)-9-Tetradecenoic qui ont un poids moléculaire de 226 g mol⁻¹; **Article 1**), c'est l'ensemble du spectre de masse (mélange complexe de taille de fragment d'ion, **Fig.22**) qui va nous donner les informations structurales nécessaires à l'identification du composé chimique. Nous avons principalement utilisé la base de données NIST (National Institute of Standards and Technology) pour l'identification des composés d'intérêt (NIST Chemistry WebBook, <https://webbook.nist.gov/chemistry/>). Une fois le composé identifié, il est également possible de vérifier la proposition faite par la librairie NIST en regardant si le RI du composé proposé est cohérent avec celui calculé. Ceci peut être fait grâce à la base de données THE PHEROBASE (<http://www.pherobase.com/>) qui fournit les RI des composés en fonction du type de colonne utilisée lors de l'analyse en GCMS.

Cependant, de nombreux composés sémiochimiques présents chez les animaux ne correspondent pas exactement aux composés recensés dans les bases de données existantes, il est donc difficile de leur attribuer une identification « vrai ». C'est pourquoi nous parlons généralement de « tentative d'identification ». En effet, l'unique façon d'être sûr de l'identification d'un composé serait de comparer son temps de rétention et son spectre de masse à celui d'un standard. Cependant, il s'agit d'une tâche fastidieuse et coûteuse qui nécessite souvent la synthèse des composés d'intérêt ou leur achat s'ils sont disponibles dans le commerce.

BIBLIOGRAPHIE

- Achiraman S, Archunan G, Abirami B, Kokilavani P, Suriyakalaa U, SankarGanesh D, Kamalakkannan S, Kannan S, Habara Y, Sankar R. 2011. Increased squalene concentrations in the clitoral gland during the estrous cycle in rats: an estrus-indicating scent mark? *Theriogenology* **76**: 1676–1683.
- Albone ES. 1984. *Mammalian Semiochemistry*. New York: John Wiley.
- Allainé D. 2000. Sociality, mating system and reproductive skew in marmots: evidence and hypotheses. *Behavioural Processes* **51**: 21–34.
- Allainé D. 2004. Sex ratio variation in the cooperatively breeding alpine marmot *Marmota marmota*. *Behavioral Ecology* **15**: 997–1002.
- Allainé D, Brondex F, Graziani L, Coulon J, Till-Bottraud I. 2000. Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behavioral Ecology* **11**: 507–514.
- Allainé D, Graziani L, Coulon J. 1998. Postweaning mass gain in juvenile alpine marmots *Marmota marmota*. *Oecologia* **113**: 370–376.
- Allainé D, Rodrigue I, Berre ML, Ramousse R. 1994. Habitat preferences of alpine marmots, *Marmota marmota*. *Canadian Journal of Zoology* **72**: 2193–2198.
- Allainé D, Theuriau F. 2004. Is there an optimal number of helpers in Alpine marmot family groups? *Behavioral Ecology* **15**: 916–924.
- Armitage KB. 2014. *Marmot biology: sociality, individual fitness, and population dynamics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Arnold W. 1988. Social thermoregulation during hibernation in alpine marmots (*Marmota marmota*). *Journal of Comparative Physiology B* **158**: 151–156.
- Arnold W. 1990. The evolution of marmot sociality. I. Why disperse late? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **27**: 229–237.
- Arnold W. 1993a. Energetics of social hibernation. In: Carey C, Florant GL, Wunder BA, Horwitz B, eds. *Life in the cold: ecological, physiological, and molecular mechanisms*. Boulder: Westview Press, 65–80.
- Arnold W. 1993b. Social evolution in marmots and the adaptive value of joint hibernation. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* **86**: 79–93.
- Arnold W, Dittami J. 1997. Reproductive suppression in male Alpine marmots. *Animal Behaviour* **53**: 53–66.
- Arnold W, Heldmaier G, Ortmann S, Pohl H, Ruf T, Steinlechner S. 1991. Ambient temperatures in hibernacula and their energetic consequences for alpine marmots *Marmota marmota*. *Journal of Thermal Biology* **16**: 223–226.
- Bel MC, Coulon J, Sreng L, Allainé D, Bagnères AG, Clément JL. 1999. Social signals involved in scent-marking behavior by cheek-rubbing in Alpine marmots (*Marmota marmota*). *Journal of Chemical Ecology* **25**: 2267–2293.

- Bel MC, Porteret C, Coulon J. 1995. Scent deposition by cheek rubbing in the alpine marmot (*Marmota marmota*) in the French Alps. *Canadian Journal of Zoology* **73**: 2065–2071.
- Berger V. 2015. Ph.D. Thesis. Senescence and sociality: the example of the Alpine marmot (*Marmota marmota*).
- Bertolino S, di Montezemolo NC, Bassano B. 2009. Food-niche relationships within a guild of alpine ungulates including an introduced species. *Journal of Zoology* **277**: 63–69.
- Black CC. 1972. Holarctic evolution and dispersal of squirrels (Rodentia: Sciuridae). In: Dobzhansky T, Hecht MK, Steere WC, eds. *Evolutionary Biology*. New York: Springer US, 305–322.
- Blumstein DT, Armitage KB. 1999. Cooperative breeding in marmots. *Oikos* **84**: 369–382.
- Blumstein DT, Henderson SJ. 1996. Cheek-rubbing in golden marmots (*Marmota caudata aurea*). *Journal of Zoology* **238**: 113–123.
- Brandler OV, Lyapunova EA. 2009. Molecular phylogenies of the genus *Marmota* (Rodentia Sciuridae): comparative analysis. *Ethology Ecology & Evolution* **21**: 289–298.
- Cohas A, Bonenfant C, Gaillard JM, Allainé D. 2007a. Are extra-pair young better than within-pair young? A comparison of survival and dominance in alpine marmot. *Journal of Animal Ecology* **76**: 771–781.
- Cohas A, Yoccoz NG, Allainé D. 2007b. Extra-pair paternity in alpine marmots, *Marmota marmota*: genetic quality and genetic diversity effects. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **61**: 1081–1092.
- Cohas A, Yoccoz NG, Bonenfant C, Goossens B, Genton C, Galan M, Kempenaers B, Allainé D. 2008. The genetic similarity between pair members influences the frequency of extrapair paternity in alpine marmots. *Animal Behaviour* **76**: 87–95.
- Cohas A, Yoccoz NG, Da Silva A, Goossens B, Allainé D. 2006. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot (*Marmota marmota*): the roles of social setting and female mate choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59**: 597–605.
- Dixon SJ, Brereton RG, Soini HA, Novotny MV, Penn DJ. 2006. An automated method for peak detection and matching in large gas chromatography-mass spectrometry data sets. *Journal of Chemometrics* **20**: 325–340.
- Drea CM, Boulet M, Delbarco-Trillo J, Greene LK, Sacha CR, Goodwin TE, Dubay GR. 2013. The “secret” in secretions: methodological considerations in deciphering primate olfactory communication. *American Journal of Primatology* **75**: 621–642.
- Erbajeva MA, Alexeeva NV. 2009. Pliocene-recent holarctic marmots: overview. *Ethology Ecology & Evolution* **21**: 339–348.
- Ferrandiz-Rovira M, Allainé D, Callait-Cardinal MP, Cohas A. 2016. Mate choice for neutral and MHC genetic characteristics in Alpine marmots: different targets in different contexts? *Ecology and Evolution* **6**: 4243–4257.

- Ferrari C, Pasquaretta C, von Hardenberg A, Bassano B. 2012. Intraspecific killing and cannibalism in adult Alpine marmots *Marmota marmota*. *Ethology Ecology & Evolution* **24**: 388–394.
- Goossens B, Graziani L, Waits LP, Farand E, Magnolon S, Coulon J, Bel MC, Taberlet P, Allainé D. 1998. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **43**: 281–288.
- Hackländer K, Arnold W. 1999. Male-caused failure of female reproduction and its adaptive value in alpine marmots (*Marmota marmota*). *Behavioral Ecology* **10**: 592–597.
- Hackländer K, Möstl E, Arnold W. 2003. Reproductive suppression in female Alpine marmots, *Marmota marmota*. *Animal Behaviour* **65**: 1133–1140.
- Humphries MM, Thomas DW, Kramer DL. 2003. The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiological and Biochemical Zoology* **76**: 165–179.
- Jennions MD, Macdonald DW. 1994. Cooperative breeding in mammals. *TRENDS in Ecology & Evolution* **9**: 89–93.
- Körtner G, Heldmaier G. 1995. Body weight cycles and energy balance in the Alpine marmot (*Marmota marmota*). *Physiological Zoology* **68**: 149–163.
- Kruckenhauser L, Pinsker W, Haring E, Arnold W. 1999. Marmot phylogeny revisited: molecular evidence for a diphyletic origin of sociality. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **37**: 49–56.
- Lardy S, Cohas A, Desouhant E, Tafani M, Allainé D. 2012. Paternity and dominance loss in male breeders: the cost of helpers in a cooperatively breeding mammal. *PLoS ONE* **7**: e29508.
- Lardy S, Cohas A, Figueroa I, Allainé D. 2011. Mate change in a socially monogamous mammal: evidences support the “forced divorce” hypothesis. *Behavioral Ecology* **22**: 120–125.
- Lenti Boero D. 1995. Scent-deposition behaviour in Alpine Marmots (*Marmota marmota* L.): its role in territorial defence and social communication. *Ethology* **100**: 26–38.
- Liu D, Huang KJ, Zhang JX. 2011. Individual recognition and odor in rat-like hamsters: behavioral responses and chemical properties. *Chemical Senses* **36**: 799–810.
- López BC, Pino J, López A. 2010. Explaining the successful introduction of the alpine marmot in the Pyrenees. *Biological Invasions* **12**: 3205–3217.
- Perrin C, Allainé D, Le Berre M. 1993. Socio-spatial organization and activity distribution of the Alpine marmot *Marmota marmota*: preliminary results. *Ethology* **93**: 21–30.
- Polly PD. 2003. Paleophylogeography: The tempo of geographic differentiation in marmots (*Marmota*). *Journal of Mammalogy* **84**: 369–384.

- Ponmanickam P, Palanivelu K, Govindaraj S, Baburajendran R, Habara Y, Archunan G. 2010. Identification of testosterone-dependent volatile compounds and proteins in the preputial gland of rat *Rattus norvegicus*. *General and Comparative Endocrinology* **167**: 35–43.
- Psenner H. 1957. Neues vom Murmeltier, *Marmota m. marmota* (Linne 1758). *Säugetierk. Mitt.* **5**: 4–10.
- Rausch RL, Bridgens JG. 1989. Structure and function of sudoriferous facial glands in Nearctic marmots, *Marmota spp.* (Rodentia: Sciuridae). *Zoologischer Anzeiger* **223**: 265–282.
- Rudatis A, De Battisti R. 2005. Alimentazione di *Marmota marmota* praterie altimontane delle Dolomiti Bellunesi. *Hystrix Italian Journal of Mammalogy* **16**: 135–142.
- Scordato ES, Drea CM. 2007. Scents and sensibility: information content of olfactory signals in the ringtailed lemur, *Lemur catta*. *Animal Behaviour* **73**: 301–314.
- Scordato ES, Dubay G, Drea CM. 2007. Chemical composition of scent marks in the ringtailed lemur (*Lemur catta*): glandular differences, seasonal variation, and individual signatures. *Chemical Senses* **32**: 493–504.
- Stephens PA, Frey-roos F, Arnold W, Sutherland WJ. 2002. Model complexity and population predictions. The alpine marmot as a case study. *Journal of Animal Ecology* **71**: 343–361.
- Steppan SJ, Akhverdyan MR, Lyapunova EA, Fraser DG, Vorontsov NN, Hoffmann RS, Braun MJ. 1999. Molecular phylogeny of the marmots (Rodentia: Sciuridae): tests of evolutionary and biogeographic hypotheses. *Systematic Biology* **48**: 715–734.
- Steppan SJ, Kenagy GJ, Zawadzki C, Robles R, Lyapunova EA, Hoffmann RS. 2011. Molecular data resolve placement of the Olympic marmot and estimate dates of trans-Beringian interchange. *Journal of Mammalogy* **92**: 1028–1037.
- Tafari M, Cohas A, Bonenfant C, Gaillard JM, Allainé D. 2013. Decreasing litter size of marmots over time: a life history response to climate change? *Ecology* **94**: 580–586.
- Thomas WK, Martin SL. 1993. A recent origin of marmots. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2**: 330–336.
- Vuren DV, Armitage KB. 1991. Duration of snow cover and its influence on life-history variation in yellow-bellied marmots. *Canadian Journal of Zoology* **69**: 1755–1758.
- Walter A. 1990. The evolution of marmot sociality: II. Costs and benefits of joint hibernation. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **27**: 239–246.
- Zhang JX, Liu YJ, Zhang JH, Sun L. 2008. Dual role of preputial gland secretion and its major components in sex recognition of mice. *Physiology & Behavior* **95**: 388–394.
- Zhang JX, Rao XP, Sun L, Zhao CH, Qin XW. 2007. Putative chemical signals about sex, individuality, and genetic background in the preputial gland and urine of the house mouse (*Mus musculus*). *Chemical Senses* **32**: 293–303.

Chapitre 3

COMMUNICATION CHIMIQUE & SELECTION SEXUELLE

Chapitre 3

ARTICLE I:

Anal scent gland secretions inform on sexual maturity, sex and social status in the alpine marmot, *marmota marmota* (rodentia: sciuridae): a role in intrasexual competition in cooperative breeders?

Timothée Zidat, Anne-béatrice Dufour, Guillaume Meiffren, Marianne Gabirot, Gilles Comte & Dominique Allainé

Publié dans *Biological Journal of the Linnean Society* (2018), **125**, 229–239



© Carole et Denis Favre-Bonvin

VALORISATION INTERNATIONNALE

International Society for Behavioral Ecology Conference

(11-16 Août 2018 à Minneapolis, USA)

Communication orale:

« Anal scent gland secretions inform on sexual maturity, sex, and social status in the Alpine marmot: a role in intra-sexual competition in cooperative breeders? »

ABSTRACT

In cooperative breeders, reproductive skew is extreme and leads to intense intrasexual competition for access to reproduction in both sexes. Given that securing the dominant position is costly, dominant animals should direct their aggressiveness towards same-sex subordinates that are potential competitors. Chemical communication has been reported to be involved in intrasexual competition in several mammalian species, and odour may be used as a cue to identify potential competitors. We predicted that odour should inform on sexual maturity, sex and social status in cooperative breeders. We tested these predictions in the Alpine marmot, a cooperatively breeding species, in which anal gland secretions are involved in aggressive behaviour. We sampled anal gland scents from 154 individuals of differing sexual maturity status, sex and social status. We found that anal gland secretions may inform on sexual maturity. When focusing on adult individuals, we found that anal gland scent differed according to sex and social status. Our results support the hypothesis that anal gland scent could be involved in intrasexual competition in Alpine marmots by allowing dominant individuals to target their aggressiveness towards same-sex competitors (i.e. sexually mature subordinates), resulting in the reproductive suppression of subordinates.

ADDITIONAL KEYWORDS: chemical label – dominance status – gas chromatography-mass spectrometry – odour cues – olfaction – sexual maturation – social species – wild population.

INTRODUCTION

Reproductive skew is extreme in singularly breeding species where a pair of dominant breeders is helped by non-reproducing subordinates (Silk, 2007). In cooperative breeders, this skew generates an intense intrasexual competition for access to dominance (and therefore to reproduction) in both sexes (Hauber & Lacey, 2005; Clutton-Brock *et al.*, 2006; Clutton-Brock & Huchard, 2013). Indeed, individuals that reach sexual maturity in those species may disperse in search of a dominant position in another family group or delay dispersal and stay in their family group as sexually mature but non-reproductive subordinates. Sexually mature subordinates that delay dispersal thus become potential competitors for the same-sex dominant, and this generates intrasexual competition within the family group. The risk of losing the dominant status compels dominant individuals to try to control the behaviour of subordinates to solve conflicts over dominance, and thus over reproduction (Cant & Johnstone, 2009; Clutton-Brock, 2009). Usually, they manage to secure their social status (and consequently their access to reproduction) either by expelling competitors from their social group (Dobson, 1982; Clutton-Brock *et al.*, 1998; Johnstone & Cant, 1999; Cant *et al.*, 2010) or by suppressing the reproduction of subordinates (Magrath *et al.*, 2004; Saltzman *et al.*, 2008; Young, 2009). Given that securing the dominant position is costly (e.g. by suppressing the reproduction of subordinates; Bell *et al.*, 2012), dominant individuals should target their aggressiveness towards potential same-sex competitors (Young, 2009; Clutton-Brock & Huchard, 2013). This requires dominant individuals to be able to recognize those competitors and subordinate individuals to be able to recognize the animals they have to challenge. Dominant and subordinate individuals can mutually identify themselves using different non-exclusive sources of information, such as visual (posture and behaviour), acoustic and olfactory cues (Candolin, 2003; Bretman *et al.*, 2011).

Chemical communication is widely used in the animal kingdom, and many studies have provided evidence for the importance of chemical communication in reproduction and social interactions (for review, see Johansson & Jones, 2007; Wyatt, 2014). Mammal scents provide information about signallers, such as species identity (e.g. delBarco-Trillo *et al.*, 2011, 2012; Zabaras *et al.*, 2005), but also individual identity [scent may code for sex

(e.g. MacDonald *et al.*, 2008; Kean *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2014), age (e.g. Buesching *et al.*, 2002; Kean *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2014) or sexual maturity (adult *vs* subadult; e.g. Linklater *et al.*, 2013; Vaglio *et al.*, 2016; Spence-Aizenberg *et al.*, 2018)]. Several studies also reported that scent may inform on social status (e.g. Burgener *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010; Tinnesand *et al.*, 2013). Signalling of the social status of an individual has been interpreted in the context of intraspecific communication and territorial behaviour. Indeed, this information may be used in assessment of competitors by allowing conspecifics to evaluate the potential threat posed by an intruder (Gosling & Roberts, 2001; Tinnesand *et al.*, 2013). Chemical communication in relationship to intrasexual competition is expected to occur in cooperative breeders but is still poorly documented (Ziegler, 2013). If dominant individuals and subordinate competitors are able to recognize each other using chemical signals, we make the following predictions:

1. Odour should inform on sexual maturity. Therefore, we expect the odour of sexually mature individuals (adult animals) to be different from that of immature individuals.
2. Odour should inform on sex in adult individuals because competition for dominance (and reproduction) in singular breeders mainly occurs among same-sex individuals. Among adult individuals, we expect that odour should differ between males and females.
3. Odour should inform on social status in adult individuals. Therefore, we expect dominant individuals to have different odours from subordinate ones.

The Alpine marmot (*Marmota marmota*) is well suited to test these predictions. The Alpine marmot is a socially monogamous and cooperatively breeding species that lives in family groups of two to 20 individuals (Allainé, 2000). A family group is typically composed of a dominant pair, adult subordinates (sexually mature but non-reproducing) and immature (pups and yearlings) individuals of both sexes (Allainé *et al.*, 2000). Individuals of both sexes stay in their family group until they reach sexual maturity when 2 years old. Then, they can either disperse to gain dominance in another family group or delay dispersal and become potential competitors for the same-sex dominants in their

family group (Allainé, 2000). Intrasexual competition for dominance occurs year-round and may result in the current dominant individual being evicted, evicting same-sex adult competitors or suppressing the reproduction of non-evicted subordinates (Arnold & Dittami, 1997; Hackländer *et al.*, 2003). This suppression is physiological and mediated mainly through aggression towards sexually mature subordinates (Hackländer *et al.*, 2003). Reproductive suppression is complete in subordinate females, whereas some subordinate males can successfully gain some extra-pair paternity (Goossens *et al.*, 1998; Cohas *et al.*, 2006).

Some observations suggest that chemical communication is involved in intrasexual competition in the Alpine marmot. Alpine marmots have three anal gland papillae that can be protruded from the anus, but their function is poorly known. However, this gland seems not to be used in territory scent marking (which is instead done by cheek rubbing with orbital glands; Bel *et al.*, 1995) but may still be used in intrasexual competition. Indeed, during encounters between adult members of a group, individuals often closely circle each other with flagging tails and then seem to expose their anal glands (D.A., pers. obs.), a behaviour also described during aggressive interactions between male yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*) (Armitage, 2014).

Here, we investigate the chemical composition of anal gland secretions in a wild population of Alpine marmots, using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). We aim to compare the chemical composition of individual marmot scents, which may differ according to sexual maturity status, sex and social status, and to identify which compounds are involved in these possible differences. We predict that the chemical composition of Alpine marmot anal gland scents is used in social recognition, particularly for intrasexual competition between same-sex individuals.

MATERIAL AND METHODS

Our study site was located in the nature reserve of La Grande Sassi re (French Alps) at an elevation of 2400 m. Alpine marmots emerge from hibernation in early April, and mating occurs during the 2 or 3 weeks after emergence (Psenner, 1957). Dominant females gestate for 30 days, and lactate pups in their natal burrows for 40 days; therefore, pups emerge between mid-June and mid-July (Psenner, 1960; Arnold, 1990). Between mid-May and mid-July 2016, we captured 154 Alpine marmots (detailed in Table 1) from 21 family groups using two-door live traps placed near the main burrows of each territory and baited with dandelions (*Taraxacum densleonis*). We tranquilized individuals using Zoletil 100 (0.1 mL.kg⁻¹) and identified each animal with a transponder and a numbered ear-tag (placed on the right for the females and on the left for the males, for easier identification during field observations). Dominant individuals were also recognizable from a coloured plastic tag attached on the opposite ear. We estimated the social status of each adult (dominant vs. subordinate) based on scrotal development for males and development of teats for females, and we confirmed our assessment by behavioural observations (territorial scent markings; Bel *et al.*, 1995, 1999).

Table 1: Number of animals sampled according to sexual maturity status, social status, and sex.

Sexual maturity status	Immature		Sexually mature			
Social status	Subordinate		Subordinate		Dominant	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of animals	57	34	22	11	14	16

Note: Immature individuals are pups or yearlings. Sexually mature subordinates were 2 (N=28) or 3 years old (N=4), and dominant individuals were 3 years old (N=5) or older, up to 12 years old (N=25).

Ethical note

The two-door live traps were checked every half hour to limit the time spent by a marmot in a trap and thus reduce its exposure to predators and the weather. Once captured, marmots were transferred in an opaque jute bag (to limit stress) to a field laboratory room where handling occurred. Once tranquilized, handling lasted a maximum of 10 min. The recovery did not require the use of an antidote, and the marmots were placed in a cool, quiet room for 15 min after handling to recover, until they were able to walk. All tranquilized marmots recovered well, and no adverse effects were noticed; all individuals were observed alive the day after their capture. Tranquilization of pregnant or lactating females did not have any obvious impact upon their offspring, because all the females successfully raised offspring to weaning. Overall, individuals were absent from their territory for a maximum of 40 min, and we never observed exclusion from the territory for any individual of any age after capture. Marmots were tranquilized no more than once a year and, in case of recapture the same year, the marmot was weighed and then released without additional handling.

All handling and sampling were done by T.Z. and Sylvia Pardonnet, who are authorized for experimentation with animals by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (diploma no. R69UCBLENVL-F1-03 and no. R-13CNRS-F1-10). The protocol was approved by the University of Lyon 1 Ethical Committee (CEEA-55, protocol BH2012-92-V1), and the authorization to capture Alpine marmots was issued by the Préfecture de Savoie (arrêté préfectoral no. 2017/41) after approval by the advisory committee of the Nature Reserve of La Grande Sassièrè.

Collection of scent samples

After the Alpine marmots had been tranquilized, the anal glands were cleaned with ethanol to remove any environmental contaminants. Then, we collected odoriferous secretions by gently squeezing the area around the gland, wearing clean nitrile gloves to avoid contamination by human chemicals. Each sample was collected with a 50 μ L glass capillary and placed into a 1.5 mL opaque chromatographic glass vial filled with 200 μ L of

dichloromethane solvent (HiPerSolv CHROMANORM for HPLC; VWR, Center Valley, PA, USA). In each 200 μL we added an internal standard, biphenyl (molecular weight, 154.21 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 99.5%; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at a concentration of 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Vials were sealed with a Teflonlined cap and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the field and at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the laboratory until GC-MS analysis. In addition to these scent samples, several “field control samples” (i.e. with solvent but without marmot secretions) were collected using the same protocol, to identify potential contaminants.

Gas chromatography–mass spectrometry analysis

Just before GC-MS analyses, we transferred all liquid scent samples (including “field control samples”) to 0.3 mL inserts in new, clean vials. We used an interfaced Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph system equipped with a non-polar DB-5 MS column (30 m long $\times$ 0.25 mm internal diameter $\times$ 0.25 μm film thickness; Agilent Technologies) coupled with an HP 5973 MDS (mass selective detector) mass spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). We used helium as the carrier gas at a flow rate of 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and an electron impact ionization of 70 eV. The temperature of injection was set to $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, and 1 μL of sample was injected automatically in splitless mode after being vortexed to homogenize the scent sample. The oven temperature programme started with 4 min at $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, then increased by $12\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ up to $210\text{ }^{\circ}\text{C}$, and then increased again by $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ up to $310\text{ }^{\circ}\text{C}$, and finally was held at $310\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, resulting in a total programme time of 39 min. We ran blank samples containing only 200 μL of dichloromethane every seven samples. These controls provided an estimate of the potential noise related to the potential accumulation of some compounds along the column, for example.

Identification of compounds

We tentatively identified anal gland secretion compounds using the Kovats retention index (RI) and the mass spectrum obtained by Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (B.07.01 version), which were then cross-checked with the National Institute of Standards and Technology (NIST) WebBook. We calculated RIs of compounds by means of a mixture of C_7 – C_{40} alkanes with known RIs (Supelco; Sigma Aldrich, St Louis, MO,

USA; 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diluted at 1:100 in hexane) run in identical gas chromatographic conditions. Whenever possible, we proposed the name of a compound or its chemical family.

Chemical analyses

Data acquisition and pre-treatment

The area of every peak (i.e. integration of the area under the curve) was obtained by an automatic integration with Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (B.07.01 version), and we manually checked each integration to avoid software errors. Then, we used AMDIS (automated mass spectral deconvolution and identification system) software to control the mass spectral similarity of peaks between all samples, in order to be sure of the peak identification from one individual to another. Furthermore, the internal standard (biphenyl) was used to control instrument drift over time. Three compounds were found in all field control samples and in all scent samples and were therefore considered as contaminants and removed from the analyses. We also removed compounds found in < 5% of the total individuals because they were considered to be too rare to contribute to the discrimination of each group (e.g. Harris *et al.*, 2012). Then, we calculated the relative abundance of each compound by converting each single peak area into a percentage of the sum of all compound areas for a given individual. Finally, we removed peaks with a relative abundance < 0.05% to exclude background noise (Drea *et al.*, 2013), and we square-root transformed the final data set to reduce the impact of the most abundant compounds upon our analyses (Clarke & Warwick, 2001).

Statistical analyses

We first tested the prediction that the odour of sexually mature individuals is different from that of immature individuals. We also tested whether odour informs on sex and differs between males and females. For that, we calculated Euclidean distances between every pair of samples to produce a resemblance matrix, from which we conducted a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; Anderson, 2001, 2017),

using 9999 permutations on the full final data set to test whether chemical profiles differed according to sexual maturity status and sex.

As proposed by Drea *et al.* (2013), we carried out a principal components analysis on the correlation matrix to reduce the number of compounds and to highlight only those that explain most of the variance. We decided to retain compounds with a cumulative contribution on the first three axes > 50% of the total contribution. We then conducted a second PERMANOVA on the chemical data subset to check that this compound selection did not change results obtained with the first PERMANOVA. Finally, we performed a linear discriminant analysis (LDA) on the chemical data subset to investigate whether variation in the chemical composition of anal gland scents can be used to separate individuals according to their sexual maturity status and to their sex, and we specified the chemical compounds implicated in the previous analyses.

In a second step, we focused on sexually mature individuals, to test predictions that odour informs on sex and social status in adult individuals. We selected sexually mature individuals ($N = 63$) and again removed compounds found in < 5% of adult individuals. As before, we conducted a PERMANOVA using the same parameters, to test whether chemical profiles differed according to sex and social status. We used the same compound selection as before to conduct the second PERMANOVA, to verify that this selection would not change results. Finally, we performed an LDA on the chemical data subset, to investigate whether variation in the chemical composition of anal gland scents allows separation of sexually mature individuals by their sex and social status, and we again specified the chemical compounds implicated in the previous analyses.

All statistical analyses were conducted in R v. 3.4.3 (R Core Team, 2017), with “ade4” (Dray & Dufour, 2007) and “adegraphics” packages (Siberchicot *et al.*, 2017) for principal components analysis, the “vegan” package (*adonis2* function; Oksanen *et al.*, 2018) for PERMANOVAs and the “MASS” package (*lda* function; Venables & Ripley, 2002) for the LDAs.

Table 2 : Chemical compounds retained in the linear discriminant analysis to separate individuals according to sexual maturity status.

Number of compound	Retention time (min)	RI calculated	Molecular weight (gmol ⁻¹)	Name of compound proposed	Formula	Cos
1	7.075	-	99	Piperidin-2-one	C ₅ H ₉ NO	0.72*†
2	9.251	1328	150	3-Phenylpropanoic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.68*†
3	11.9	1558	200	Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	-0.52*‡
4	13.542	1720	226	Pentadecanal	C ₁₅ H ₃₀ O	0.43
5	13.72	1739	226	(Z)-9-Tetradecenoic acid	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	-0.44
6	13.886	1757	228	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	-0.76*‡
7	14.499	1821	240	Hexadecanal	C ₁₆ H ₃₂ O	0.44
8	14.566	1827	234	Bakkenolide A	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	-0.42
9	14.846	1856	242	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	-0.33
10	15.512	1922	-	Hexadecenoic acid derivative	C ₁₆ H ₃₄ O ₂	-0.24
11	15.704	1940	254	9-Hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	-0.55*‡
12	15.914	1959	256	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-0.73*‡
13	16.702	2030	-	Heptadecanoic acid derivative	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-0.39
14	17.023	2058	270	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-0.49
15	17.615	2108	254	5-Dodecyloxolan-2-one	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	0.87*†
16	17.973	2137	-	Octadecenoic acid derivative	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-0.70*‡
17	18.268	2161	284	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-0.74*‡
18	20.343	2321	-	Ethyl linoleate derivative	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	-0.37
19	20.902	2362	312	Eicosanoic acid	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	-0.58*‡
20	27.093	2813	410	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	-0.73*‡
21	27.814	2867	368	Cholesta-2,4-diene	C ₂₇ H ₄₄	0.48
22	31.125	3123	386	Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	-0.18
23	31.208	3130	388	Cholestanol	C ₂₇ H ₄₈ O	0.88*†
24	32.513	3236	384	Cholest-5-en-3-one	C ₂₇ H ₄₄ O	0.62*†

Abbreviations: Cos, cosines between the 24 compounds and the first axe of the linear discriminant analysis (proxy of the contribution to the discriminant function); and RI calculated, Kovats' retention index calculated using a mixture of C₇-C₄₀ alkanes with known RIs. *Compounds having a cosine > 0.5 (as an absolute value). †Compounds characterized sexually mature individuals. ‡Compounds characterized immature individuals.

RESULTS

A total of 82 chemical compounds were detected in scent samples from 154 individuals (mean $\pm$ SD, 30.96 ± 5.17 compounds per individual). We found that the chemical composition of the anal gland secretion of Alpine marmots contained a mixture of small volatile and large non-volatile chemical compounds, from piperidin-2-one (molecular weight, 99.13 g.mol^{-1}) to lanosterol (molecular weight, $426.71 \text{ g.mol}^{-1}$).

Scent of sexual maturity status

The PERMANOVA performed on the whole data set indicated a difference between sexually mature individuals and immature ones (pseudo- $F F_{1,150} = 80.68$, $P = 0.0001$), but neither the sex effect (pseudo- $F F_{1,150} = 1.34$, $P = 0.22$) nor the interaction between sex and sexual maturity status (pseudo- $F F_{1,150} = 1.15$, $P = 0.28$) was significant. The principal components analysis led us to select 24 chemical compounds for the subsequent analyses (**Table 2**), which had a global contribution to the first three axes $> 50\%$. The PERMANOVA performed on those 24 compounds gave similar results to the one performed on the whole data set (sexual maturity status, pseudo- $F F_{1,150} = 117.10$, $P = 0.0001$; sex, pseudo- $F F_{1,150} = 1.10$, $P = 0.30$; and interaction, pseudo- $F F_{1,150} = 1.11$, $P = 0.29$), indicating that no important chemical information was lost using our procedure of compound selection.

The LDA performed well at separating sexually mature from immature individuals on the basis of these 24 compounds (**Fig.23**), correctly assigning 95.60% of sexually mature individuals and 96.83% of immature individuals. Five compounds characterized sexually mature individuals, whereas eight other compounds were strongly characteristic of immature individuals (**Table 2**). Specifically, the anal gland secretions of sexually mature individuals appeared to be characterized by a high relative abundance of various chemical families, such as alkaloid (piperidin-2-one), carboxylic acid (3-phenylpropanoic acid), lactone (5-dodecyloxolan-2-one) and steroids (cholestanol and cholest-5-en-3-one). In contrast, anal gland secretions of immature individuals were relatively rich in fatty acids (e.g. dodecanoic acid, tetradecanoic acid, 9-hexadecanoic acid, hexadecanoic acid,

octadecenoic acid derivative, octadecanoic acid and eicosanoic acid). They also presented a high relative abundance of a triterpene (squalene).

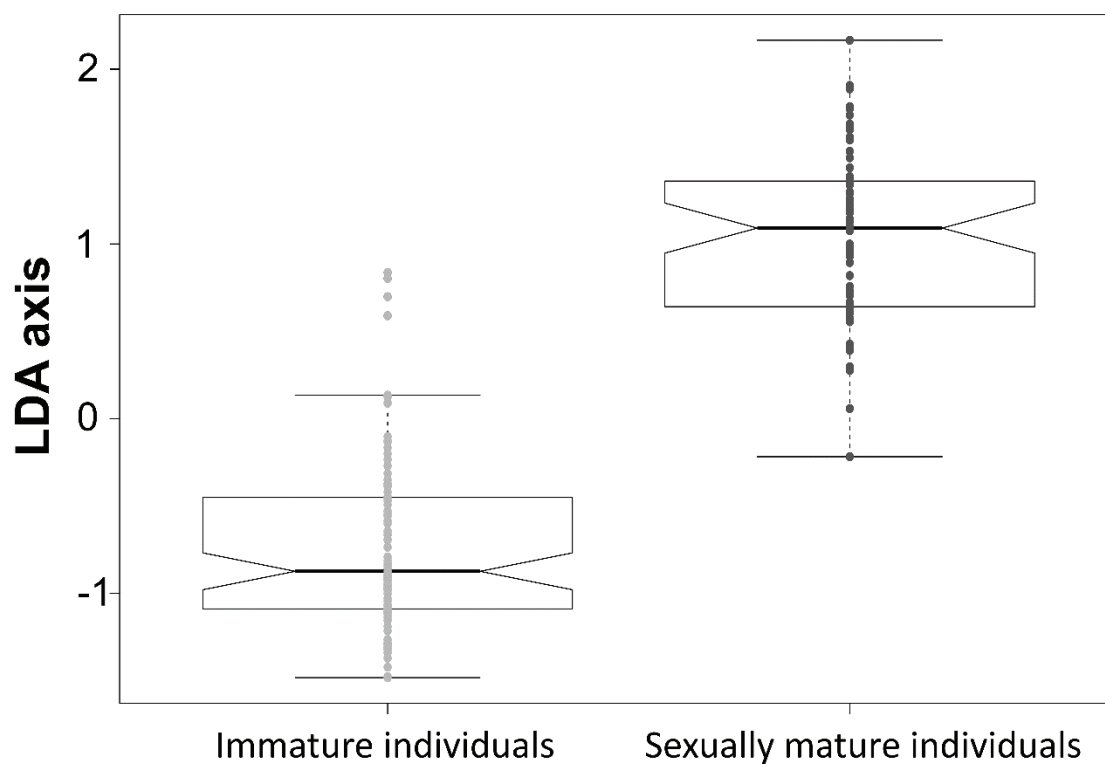


Figure 23 : Box-plot of the score on the axis of the linear discriminant analysis (LDA) separating immature (light grey circles) from sexually mature individuals (dark grey circles).

Scent informs on sex and social status in adult individuals

Of the 82 chemical compounds, 16 disappeared or were found in < 5% of sexually mature individuals. The PERMANOVA performed on the remaining 66 chemical compounds indicated a difference between social status (pseudo-F $F_{1,59} = 4.58$, $P = 0.003$), but not between sexes (pseudo-F $F_{1,59} = 1.90$, $P = 0.096$), and a significant interaction between sex and social status (pseudo-F $F_{1,59} = 3.23$, $P = 0.02$). Of the 24 selected chemical compounds, five disappeared or were found in < 5% of sexually mature individuals [dodecanoic acid, (Z)-9-tetradecenoic acid, bakkenolide A, heptadecanoic acid derivative and ethyl linoleate derivative; Table 2]. The PERMANOVA performed on the 19 remaining compounds gave similar results to the one performed on the 66 compounds (social status, pseudo-F $F_{1,59} = 6.11$, $P = 0.031$; sex, pseudo-F $F_{1,59} = 1.58$, $P = 0.18$; and interaction, pseudo-F $F_{1,59} = 3.48$, $P = 0.032$), indicating that no chemical information was lost using our procedure for compound selection.

The first two axes of the LDA performed on the 19 compounds separated adult individuals according to sex and social status well (**Fig.24**). The first axis clearly opposed subordinate individuals and dominant individuals, whereas the second axis clearly opposed females and males. The LDA correctly assigned 87.50% of dominant females (only two dominant females were misclassified as dominant males) and 72.73% of subordinate females (three subordinate females were misclassified as subordinate males). In males, the LDA correctly assigned subordinate individuals much better than dominant individuals (90.91% and 64.29%, respectively). Two dominant males were misclassified as dominant females, and three of them were misclassified as subordinate males, whereas only two subordinate males were misclassified, as a dominant male and a female. We found that anal gland secretions of sexually mature female Alpine marmots were relatively rich in fatty acids, piperidin-2-one (alkaloid) and cholestanol (steroid) compared with male individuals. Anal gland secretions of male Alpine marmots were instead relatively rich in hexadecenoic acid derivative (fatty acid), pentadecanal and hexadecanal (aldehydes), squalene (triterpene), cholesterol (steroid) and 3-phenylpropanoic acid (carboxylic acid) (**Fig.25**). Furthermore, anal gland secretions of subordinate male Alpine marmots were relatively rich in cholesterol (steroid) and 3-phenylpropanoic acid

(carboxylic acid) compared with dominant male individuals. Conversely, anal gland secretions of dominant female Alpine marmots were relatively rich in cholesterol (steroid) and pentadecanoic acid (fatty acid). One lactone (5-dodecyloxonan-2-one) seems to characterize dominant individuals, regardless of their sex (**Fig.25**).

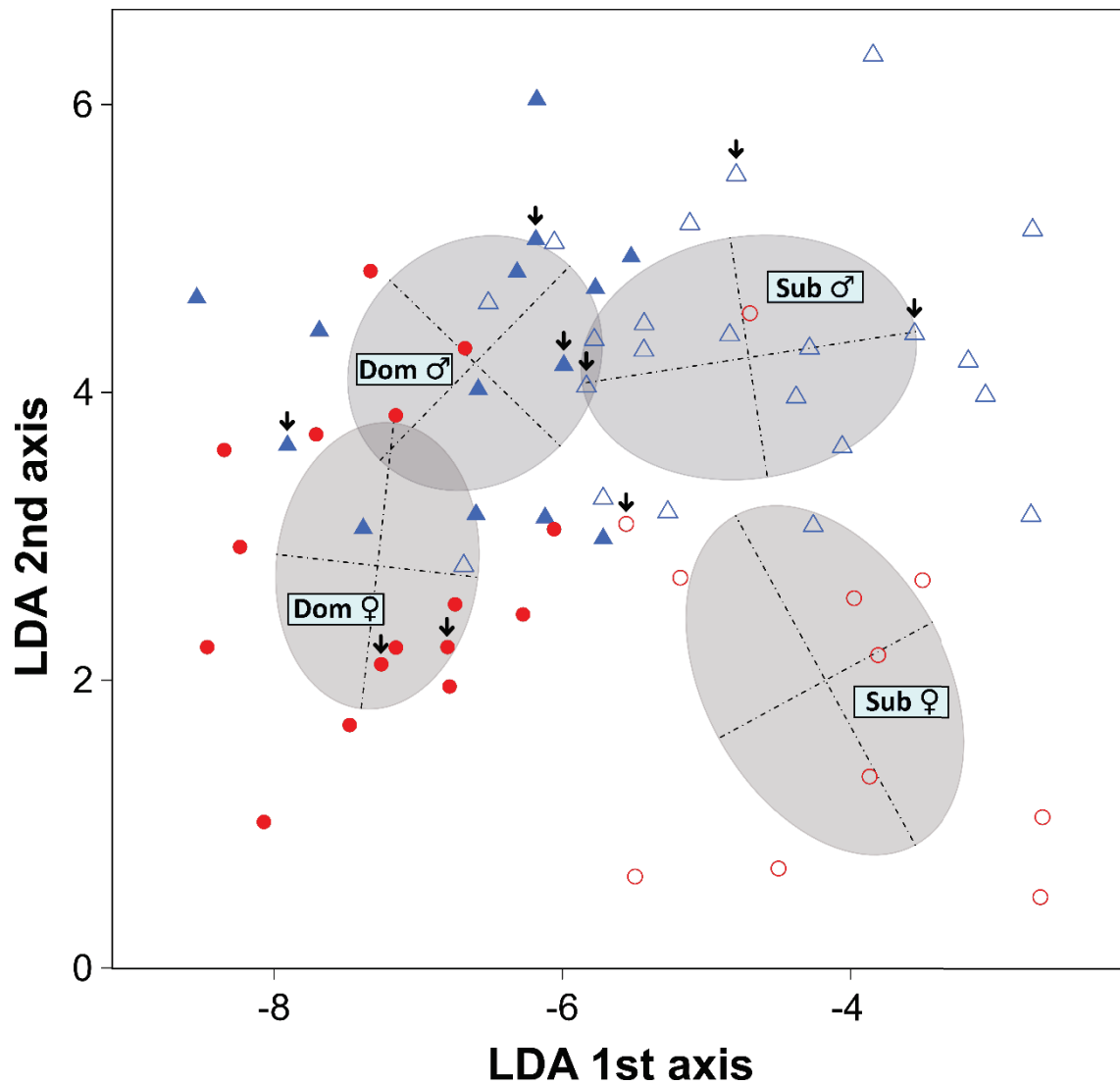


Figure 24 : First factorial map of the linear discriminant analysis (LDA) separating adult individuals according to sex and social status. Sex: males are represented by blue triangles and females by red circles. Social status: dominant (Dom) individuals are represented by filled symbols and subordinate (Sub) individuals by open symbols. Three year-old individuals (N = 9) are identified with an arrow.

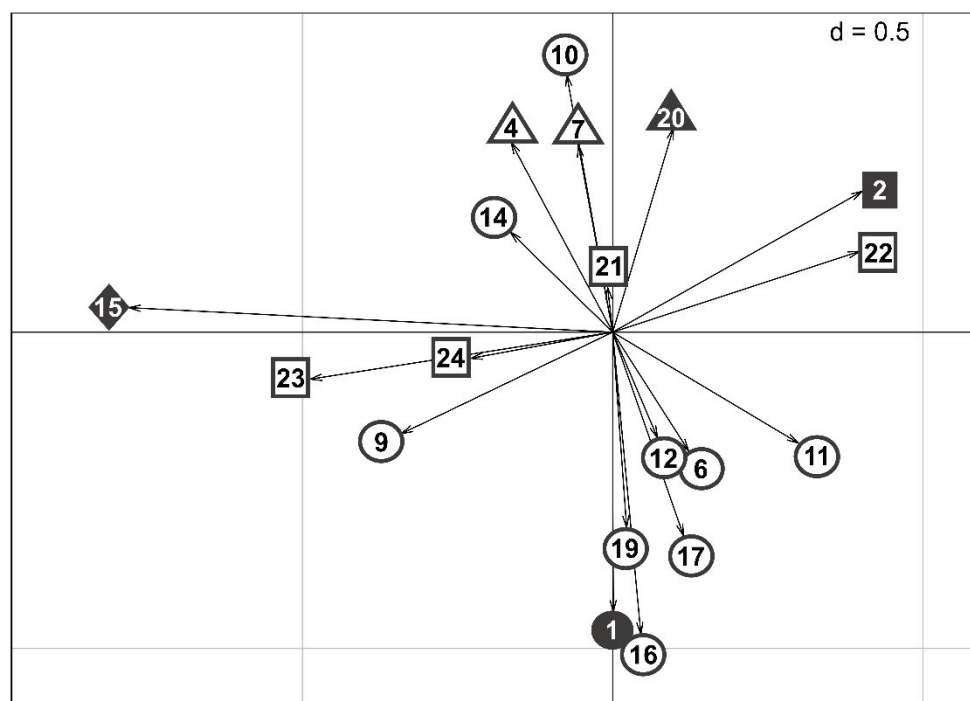


Figure 25 : Graphical representation of the cosines between the 19 compounds and the first two axes of the linear discriminant analysis separating adult individuals according to sex and social status. Each number represents a specific compound (see **Table 2** for the corresponding compounds). Each symbol represents a chemical family: alkaloid (1; filled circle), carboxylic acid (2; filled square), fatty acids (6, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 19; open circles), aldehydes (4, 7; open triangles), lactone (15; filled diamond), triterpene (20; filled triangle) and steroids (21, 22, 23, 24; open squares).

DISCUSSION

Our results indicated that the chemical composition of anal gland secretions strongly differed between sexually mature and immature Alpine marmots. When considering only adult Alpine marmots, our results also indicated that the chemical composition of anal gland secretions differed according to sex and social status.

Scent of sexual maturation

We expected that the chemical composition of anal gland secretions would change after sexual maturity. This expectation was validated in the Alpine marmot. A change in scent chemical composition with sexual maturation has previously been reported in a variety of mammals (e.g. Asian elephants, *Elephas maximus*: Rasmussen *et al.*, 2002; giant pandas, *Ailuropoda melanoleuca*: Yuan *et al.*, 2004; owl monkeys, *Aotus nancymae* and *Aotus* spp.: MacDonald *et al.*, 2008; Spence-Aizenberg *et al.*, 2018; mandrills, *Mandrillus sphinx*: Setchell *et al.*, 2010; Vaglio *et al.*, 2016; and greater sac-winged bats, *Saccopteryx bilineata*: Caspers *et al.*, 2011). Furthermore, Osada *et al.* (2009) have demonstrated that the composition of the urine of adult and prepubescent male rats differs significantly in the presence of a few specific compounds, and female rats are more attracted to the odour of adult males than that of prepubescent males, suggesting that the chemical composition of the urine of male rats is used by female rats to gain information about sexual maturity.

These differences in the chemical composition of anal gland scents between sexually mature and immature individuals might have several non-exclusive explanations. First, it is likely that these differences are a consequence of developmental processes. For example, these differences might reflect hormonal changes as individuals reach sexual maturity. Indeed, in many mammals, individuals reaching puberty show some modification of androgen concentrations (e.g. primates: Saltzman *et al.*, 2011; giraffes, *Giraffa camelopardalis*: Wolf *et al.*, 2018). Regarding testosterone, some testosterone-dependent volatile compounds found in the urine of male mice (*Mus musculus*; Novotny *et al.*, 1985) may modify male attractiveness, suggesting modification of the chemical composition by levels of testosterone (Jemiolo *et al.*, 1985). It is also possible

that these differences are the consequence of other maturation processes. For example, these differences might be explained by a change in diet with age (Hagey *et al.*, 1997; Kwak *et al.*, 2008; Schaefer *et al.*, 2010). The diet of Alpine marmots is mainly composed of leaves and flowers, particularly of dicots (Massemmin *et al.*, 1996; Garin *et al.*, 2008), but whether the diet changes with age is yet to be documented in the Alpine marmot. Finally, this could also be explained by modifications of anal gland microbial flora with ageing (e.g. van Dongen *et al.*, 2013; Leclaire *et al.*, 2014). Second, the scent of sexually mature individuals might signal to adults of the opposite sex that they are potential mates (Johansson & Jones, 2007) and to same-sex adults that they are potential competitors (Ralls, 1971; Brown 1979; Gosling & Roberts, 2001). A change of scent chemical composition as individuals mature might also be a way for immature individuals to avoid aggression by dominant individuals, which may focus their aggression towards direct competitors (Rasmussen *et al.*, 2002).

Sex effect

We expected that the chemical composition from anal gland secretions would differ between sexes. We found such a sex difference, but only in adult individuals; a result also found in mandrills (Setchell *et al.*, 2010). We found that the anal gland secretions of adult female Alpine marmots were relatively rich in cholestenol compared with adult male individuals, which was likewise found in anogenital gland secretions of female giant pandas (Yuan *et al.*, 2004). The anal gland secretions of adult male Alpine marmots were instead relatively rich in pentadecanal, and this compound has also been reported to be relatively more abundant in male than in female adult giant pandas (Yuan *et al.*, 2004).

Our results indicate that the chemical composition of anal gland scent might be used for sex recognition in the Alpine marmot. The ability of scent secretions to inform on sex is well documented in both eutherian mammals (e.g. hyena, *Crocuta crocuta*: Drea *et al.*, 2002; ring-tailed lemurs, *Lemur catta*: Hayes *et al.*, 2004; Scordato *et al.*, 2007; owl monkeys: MacDonald *et al.*, 2008; Eurasian otters, *Lutra lutra*: Kean *et al.*, 2011; brown bears, *Ursus arctos*: Rosell *et al.*, 2011; giant pandas: Yuan *et al.*, 2004) and monotremes (e.g. short-beaked echidna, *Tachyglossus aculeatus*: Harris *et al.*, 2012, 2014). Classically, sex

recognition from olfactory cues has been suggested to play a role in sexual interactions such as mate location (Alberts, 1992), mate attraction (Haymann, 2006) and mate choice (Johansson & Jones, 2007). Furthermore, Alpine marmots are not sexually dimorphic in size and colour pattern; therefore, a sex-specific chemical scent might play an important role in sex recognition in this sexually monomorphic species. We cannot discard these hypotheses, but our results also support the prediction that sex recognition from olfactory cues might allow sexually mature individuals to target same-sex competitors during competitive interactions. In the Alpine marmot, intrasexual competition for dominant status still occurs after the mating season, with dominant individuals often being challenged and evicted during the whole of the active period. Accordingly, we found sex differences in anal gland secretions sampled after the mating season. More information is needed, however, to ascertain whether sex recognition from olfactory cues plays a role in intrasexual competition in the Alpine marmot.

Social status effect

We expected that the chemical composition of anal gland secretions would differ between dominant and subordinate individuals. This expectation was validated in the Alpine marmot, suggesting that the chemical composition of anal gland secretions might convey information on social status in both sexes in the Alpine marmot. This result was consistent with other studies in mammals (e.g. Hayes *et al.*, 2002; Burgener *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010).

This social status signature in Alpine marmot anal gland secretions might be attributable, in part, to social status being confounded with age in our samples. Indeed, the majority of subordinate individuals were 2 years old, whereas all dominant individuals were 3–12 years old. However, both dominant ($N = 5$) and subordinate ($N = 4$) individuals were found among 3-year-old individuals. Three-year-old dominant individuals had chemical profiles corresponding to that of older dominants, whereas 3-year-old subordinate individuals had chemical profiles that corresponded to that of 2-year-old subordinate individuals. Although the number of 3-year-old individuals was small, these results suggest that it is unlikely that the differences we found in chemical composition of

anal gland secretions between dominant and subordinate individuals were attributable to an age effect alone.

Instead, we believe that these differences result from the outcome of intrasexual competition in Alpine marmots. Indeed, the competition for dominant status occurring between same-sex individuals within family groups of cooperative breeders results in the dominant individual suppressing the reproduction of non-evicted subordinate individuals. In Alpine marmots, there is a clear role of aggression by dominant individuals in the reproductive suppression of same-sex subordinate individuals (Arnold & Dittami, 1997; Hackländer *et al.*, 2003), whereas direct suppression through olfactory cues, as in other cooperative breeder species (e.g. inhibition of ovulation in daughters in cooperatively breeding primates; Ziegler, 2013), has not been evidenced. Aggression by dominant individuals results in high rates of stress hormones (e.g. corticosteroids), which in turn leads to low levels of testosterone in subordinate males and low levels of progesterone in subordinate females (Arnold & Dittami, 1997; Hackländer *et al.*, 2003). These physiological consequences of subordinate reproductive suppression may thus explain the differences in chemical composition we found between subordinate and dominant individuals of both sexes. However, reproductive suppression is not complete in subordinate males, which can sometimes gain extra-pair paternities (Goossens *et al.*, 1998; Cohas *et al.*, 2006). This incomplete reproductive suppression in male subordinates might explain the significant interaction between sex and social status in PERMANOVAs and may thus explain why the difference in chemical composition of anal gland secretions between dominant and subordinate individuals was more pronounced in females than in males.

The differences in anal gland scent profiles between dominant and subordinate Alpine marmots might reduce overt conflicts among same-sex group adults, as suggested in other species (e.g. owl monkeys: MacDonald *et al.*, 2008). The scent of subordinate Alpine marmots might carry a non-threatening message to dominant individuals, which might then refrain from aggression. Likewise, field observations indicated that subordinate Alpine marmots often avoided coming too close to the same-sex dominant

individuals; an avoidance also described in other species (e.g. Asian elephants; Rasmussen *et al.*, 2002).

Conclusion

Our results suggest that olfactory cues may serve in intrasexual competition in the Alpine marmot by informing others of sexual maturity, sex and dominance status. Our study supports the hypothesis that a change of scent chemical composition as individuals mature and become dominant could be a way in which to regulate the conflict (in both sexes) over access to dominance (and therefore reproduction) in cooperative breeders. Dominant individuals direct their aggressiveness towards individuals that represent the major threat and suppress the reproduction of subordinates (Young, 2009; Clutton-Brock & Huchard, 2013). However, to validate our conclusions, future behavioural experiments should investigate the response of individuals to the odour of conspecifics differing in sexual maturity, sex and social status.

REFERENCES

- Alberts AC. 1992.** Constraints on the design of chemical communication systems in terrestrial vertebrates. *The American Naturalist* **139**: S62–S69.
- Allainé D. 2000.** Sociality, mating system and reproductive skew in marmots: evidence and hypotheses. *Behavioural Processes* **51**: 21–34.
- Allainé D, Brondex F, Graziani L, Coulon J, Till-Bottraud I. 2000.** Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behavioral Ecology* **11**: 507–514.
- Anderson MJ. 2001.** A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**: 32–46.
- Anderson MJ. 2017.** Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). In: Balakrishnan N, Colton T, Everitt B, Piegorsch W, Ruggeri F, Teugels JL, eds. *Wiley statsref: statistics reference online*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 1–15.
- Armitage KB. 2014.** *Marmot biology: sociality, individual fitness, and population dynamics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Arnold W. 1990.** The evolution of marmot sociality: I. Why disperse late? *Behavioral ecology and Sociobiology* **27**: 229–237.
- Arnold W, Dittami J. 1997.** Reproductive suppression in male Alpine marmots. *Animal Behaviour* **53**: 53–66.
- Bell MBV, Nichols HJ, Gilchrist JS, Cant MA, Hodge SJ. 2012.** The cost of dominance: suppressing subordinate reproduction affects the reproductive success of dominant female banded mongooses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 619–624.
- Bel MC, Coulon J, Sreng L, Allainé D, Bagnères AG, Clément JL. 1999.** Social signals involved in scent-marking behavior by cheek-rubbing in Alpine marmots (*Marmota marmota*). *Journal of Chemical Ecology* **25**: 2267–2293.
- Bel MC, Porteret C, Coulon J. 1995.** Scent deposition by cheek rubbing in the alpine marmot (*Marmota marmota*) in the French Alps. *Canadian Journal of Zoology* **73**: 2065–2071.
- Bretman A, Westmancoat JD, Gage MJG, Chapan T. 2011.** Males use multiple, redundant cues to detect mating rivals. *Current Biology* **21**: 617–622.
- Brown RE. 1979.** Mammalian social odors: a critical review. *Advances in Study of Behavior* **10**: 103–162.
- Buesching CD, Waterhouse JS, Macdonald DW. 2002.** Gaschromatographic analyses of the subcaudal gland secretion of the European badger (*Meles meles*) part II: time-related variation in the individual-specific composition. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 57–69.

- Burgener N, Dehnhard M, Hofer H, East ML. 2009. Does anal gland scent signal identity in the spotted hyaena? *Animal Behaviour* **77**: 707–715.
- Candolin U. 2003. The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **78**: 575–595.
- Cant MA, Hodge SJ, Bell MBV, Gilchrist JS, Nicols HJ. 2010. Reproductive control via eviction (but not the threat of eviction) in banded mongooses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 2219–2226.
- Cant MA, Johnstone RA. 2009. How threats influence the evolutionary resolution of within-group conflict. *The American Naturalist* **173**: 759–771.
- Casper BA, Schroeder FC, Franke S, Voigt CC. 2011. Scents of adolescence: the maturation of the olfactory phenotype in a free ranging mammal (T Burne, Ed.). *PLoS ONE* **6**: e21162.
- Clarke KR, Warwick RM. 2001. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Plymouth: Primer-e Ltd.
- Clutton-Brock T. 2009. Cooperation between non-kin in animal societies. *Nature* **462**: 51–57.
- Clutton-Brock TH, Brotherton PNM, Smith R, McIlrath GM, Kansky R, Gaynor D, O’Riain MJ, Skinner JD. 1998. Infanticide and expulsion of females in a cooperative mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **265**: 2291–2295.
- Clutton-Brock TH, Hodge SJ, Spong G, Russell AF, Jordan NR, Bennett NC, Sharpe LL, Manser MB. 2006. Intrasexual competition and sexual selection in cooperative mammals. *Nature* **444**: 21–28.
- Clutton-Brock TH, Huchard E. 2013. Social competition and selection in males and females. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **368**: 20130074.
- Cohas A, Yoccoz NG, Da Silva A, Goossens B, Allainé D. 2006. Extra-pair paternity in the monogamous alpine marmot (*Marmota marmota*): the roles of social setting and female mate choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59**: 597–605.
- delBarco-Trillo J, Burkert BA, Goodwin TE, Drea CM. 2011. Night and day: the comparative study of strepsirrhine primates reveals socioecological and phylogenetic patterns in olfactory signals. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 82–98.
- delBarco-Trillo J, Sacha CR, Dubay GR, Drea CM. 2012. *Eulemur*, me lemur: the evolution of scent-signal complexity in a primate clade. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **367**: 1909–1922.
- Dobson FS. 1982. Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. *Animal Behaviour* **30**: 1183–1192.

- van Dongen WF, White J, Brandl HB, Moodley Y, Merklings T, Leclaire S, Blanchard P, Danchin E, Hatch SA, Wagner RH. 2013. Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BMC Ecology* 13: 11.
- Dray S, Dufour AB. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22: 1–20.
- Drea CM, Boulet M, Delbarco-Trillo J, Greene LK, Sacha CR, Goodwin TE, Dubay GR. 2013. The “secret” in secretions: methodological considerations in deciphering primate olfactory communication. *American Journal of Primatology* 75: 621–642.
- Drea CM, Vignieri SN, Kim HS, Weldele ML, Glickman SE. 2002. Responses to olfactory stimuli in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*): II. Discrimination of conspecific scent. *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)* 116: 342–349.
- Garin I, Aldezabal A, Herrero J, García-Serrano A, Remón JL. 2008. Diet selection of the Alpine marmot (*Marmota m. marmota* L.) in the Pyrenees. *Revue d'Écologie (Terre et Vie)* 63: 383–390.
- Goossens B, Graziani L, Waits LP, Farand E, Magnolon S, Coulon J, Bel MC, Taberlet P, Allainé D. 1998. Extrapair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43: 281–288.
- Gosling LM, Roberts SC. 2001. Scent-marking by male mammals: cheat-proof signals to competitors and mates. *Advances in the Study of Behavior* 30: 169–217.
- Hackländer K, Möstl E, Arnold W. 2003. Reproductive suppression in female Alpine marmots, *Marmota marmota*. *Animal Behaviour* 65: 1133–1140.
- Hagey LR, Gavrilkina MA, Hofmann AF. 1997. Agerelated changes in the biliary bile acid composition of bovids. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1193–1201.
- Harris RL, Davies NW, Nicol SC. 2012. Chemical composition of odorous secretions in the Tasmanian short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus setosus*). *Chemical Senses* 37: 819–836.
- Harris RL, Holland BR, Cameron EZ, Davies NW, Nicol SC. 2014. Chemical signals in the echidna: differences between seasons, sexes, individuals and gland types. *Journal of Zoology* 293: 171–180.
- Hauber ME, Lacey EA. 2005. Bateman's principle in cooperatively breeding vertebrates: the effects of non-breeding alloparents on variability in female and male reproductive success. *Integrative and Comparative Biology* 45: 903–914.
- Hayes RA, Morelli TL, Wright PC. 2004. Anogenital gland secretions of *Lemur catta* and *Propithecus verreauxi coquereli*: a preliminary chemical examination. *American Journal of Primatology* 63: 49–62.
- Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG. 2002. Semiochemicals and social signaling in the wild European rabbit in Australia: I. Scent profiles of chin gland secretion from the field. *Journal of Chemical Ecology* 28: 363–384.

- Haymann EW. 2006. Scent-marking strategies of New World primates. *American Journal of Primatology* 68: 650–661.
- Jemiolo B, Alberts J, Sochinski-Wiggins S, Harvey S, Novotny M. 1985. Behavioural and endocrine responses of female mice to synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Animal Behaviour* 33: 1114–1118.
- Johansson BG, Jones TM. 2007. The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 82: 265–289.
- Johnstone RA, Cant MA. 1999. Reproductive skew and the threat of eviction: a new perspective. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266: 275–279.
- Kean EF, Müller CT, Chadwick EA. 2011. Otter scent signals age, sex, and reproductive status. *Chemical Senses* 36: 555–564.
- Kwak J, Willse A, Matsumura K, Curran Opiekun M, Yi W, Preti G, Yamazaki K, Beauchamp GK. 2008. Genetically based olfactory signatures persist despite dietary variation. *PLoS ONE* 3: e3591.
- Leclaire S, Nielsen JF, Drea CM. 2014. Bacterial communities in meerkat anal scent secretions vary with host sex, age, and group membership. *Behavioral Ecology* 25: 996–1004.
- Linklater WL, Mayer K, Swaisgood RR. 2013. Chemical signals of age, sex and identity in black rhinoceros. *Animal Behaviour* 85: 671–677.
- Macdonald EA, Fernandez-Duque E, Evans S, Hagey LR. 2008. Sex, age, and family differences in the chemical composition of owl monkey (*Aotus nancymae*) subcaudal scent secretions. *American Journal of Primatology* 70: 12–18.
- Magrath WD, Johnstone RA, Heinsohn RG. 2004. Reproductive skew. In: Koenig WD, Dickinson JL, eds. *Ecology and evolution of cooperative breeding in birds*. Cambridge: Cambridge University Press, 157–176.
- Martín J, Carranza J, López P, Alarcos S, Pérez-González J. 2014. A new sexual signal in rutting male red deer: age related chemical scent constituents in the belly black spot. *Mammalian Biology* 79: 362–368.
- Massemin S, Gibault C, Ramousse R, Butet A. 1996. Premières données sur le régime alimentaire de la marmotte alpine (*Marmota marmota*) en France. *Mammalia* 60: 351–361.
- Novotny M, Harvey S, Jemiolo B, Alberts J. 1985. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 2059–2061.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2018. *vegan: community ecology package. R package version 2.4–6*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed 06 August 2018).
- Osada K, Kashiwayanagi M, Izumi H. 2009. Profiles of volatiles in male rat urine: the effect of puberty on the female attraction. *Chemical Senses* 34: 713–721.

- Psenner H. 1957. Neues vom Murmeltier, *Marmota m. marmota* (Linné 1758). *Säugetierkundliche Mitteilungen* 5: 4–10.
- Psenner H. 1960. Das Verhalten der Murmeltiere (*Marmota m. marmota*), insbesondere von Mutter und Jungen. *Säugetierkundliche Mitteilungen* 8: 144–148.
- R Core Team. 2017. *R: a language and environment for statistical computing*. Available at: <https://www.R-project.org/> (accessed 06 August 2018).
- Ralls K. 1971. Mammalian scent marking. *Science* 171: 443–449.
- Rasmussen LEL, Riddle HS, Krishnamurthy V. 2002. Mellifluous matures to malodorous in musth. *Nature* 415: 975–976.
- Rosell F, Jojola SM, Ingdal K, Lassen BA, Swenson JE, Arnemo JM, Zedrosser A. 2011. Brown bears possess anal sacs and secretions may code for sex. *Journal of Zoology* 283: 143–152.
- Saltzman W, Liedl KJ, Salper OJ, Pick RR, Abbott DH. 2008. Post-conception reproductive competition in cooperatively breeding common marmosets. *Hormones and Behavior* 53: 274–286.
- Saltzman W, Tardif SD, Rutherford JN. 2011. Hormones and reproductive cycles in primates. In: Norris DO, Lopez KH, eds. *Hormones and reproduction of vertebrates*. Academic Press, 291–327.
- Schaefer ML, Wongravee K, Holmboe ME, Heinrich NM, Dixon SJ, Zeskind JE, Kulaga HM, Brereton RG, Reed RR, Trevejo JM. 2010. Mouse urinary biomarkers provide signatures of maturation, diet, stress level, and diurnal rhythm. *Chemical Senses* 35: 459–471.
- Scordato ES, Dubay G, Drea CM. 2007. Chemical composition of scent marks in the ringtailed lemur (*Lemur catta*): glandular differences, seasonal variation, and individual signatures. *Chemical Senses* 32: 493–504.
- Setchell JM, Vaglio S, Moggi-Cecchi J, Boscaro F, Calamai L, Knapp LA. 2010. Chemical composition of scent-gland secretions in an old world monkey (*Mandrillus sphinx*): influence of sex, male status, and individual identity. *Chemical Senses* 35: 205–220.
- Siberchicot A, Julien-Laferrière A, Dufour AB, Thioulouse J. 2017. *adegraphics: an S4 lattice-based package for the representation of multivariate data*. R package version 1.0-9. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=adegraphics> (accessed 06 August 2018).
- Silk JB. 2007. The adaptive value of sociality in mammalian groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 362: 539–559.
- Spence-Aizenberg A, Kimball BA, Williams LE, Fernandez-Duque E. 2018. Chemical composition of glandular secretions from a pair-living monogamous primate: sex, age, and gland differences in captive and wild owl monkeys (*Aotus* spp.). *American Journal of Primatology* 80: e22730.

- Tinnesand HV, Jojola S, Zedrosser A, Rosell F. 2013. The smell of desperadoes? Beavers distinguish between dominant and subordinate intruders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67: 895–904.
- Vaglio S, Minicozzi P, Romoli R, Boscaro F, Pieraccini G, Moneti G, Moggi-Cecchi J. 2016. Sternal gland scentmarking signals sex, age, rank, and group identity in captive mandrills. *Chemical Senses* 41: 177–186.
- Venables WN, Ripley BD. 2002. *Modern applied statistics with S*. New York: Springer.
- Wolf TE, Schaebs FS, Bennett NC, Burroughs R, Ganswindt A. 2018. Age and socially related changes in fecal androgen metabolite concentrations in free-ranging male giraffes. *General and Comparative Endocrinology* 255: 19–25.
- Wyatt TD. 2014. *Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Young AJ. 2009. The causes of physiological suppression in vertebrate societies: a synthesis. In: Hager R, Jones CB, eds. *Reproductive skew in vertebrates: proximate and ultimate causes*. Cambridge: Cambridge University Press, 397–436.
- Yuan H, Liu D, Sun L, Wei R, Zhang G, Sun R. 2004. Anogenital gland secretions code for sex and age in the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*. *Canadian Journal of Zoology* 82: 1596–1604.
- Zabaras R, Richardson BJ, Wyllie SG. 2005. Evolution in the suite of semiochemicals secreted by the sternal gland of Australian marsupials. *Australian Journal of Zoology* 53: 257–263.
- Ziegler TE. 2013. Social effects via olfactory sensory stimuli on reproductive function and dysfunction in cooperative breeding marmosets and tamarins. *American Journal of Primatology* 75: 202–211.

Chapitre 3

ARTICLE 2:

Odours as indicators of genetic compatibility in Alpine marmot (*Marmota marmota*)?

Timothée Zidat, Stéphane Dray, Mariona Ferrandiz-Rovia, Sylvia Pardonnet,
Gilles Comte & Dominique Allainé

En cours de préparation



© Carole et Denis Favre-Bonvin

VALORISATION INTERNATIONNALE

International Conference on Ecological Sciences

(22-25 Octobre 2018 à Rennes, France)

Communication orale:

« *Cuckoldry in Alpine marmots: A role of the chemical communication?* »

Ecology & Behaviour Conference

(19-24 Mai 2019 à Toulouse, France)

Communication orale:

« *Does anal gland scent of Alpine marmots encode genetic make-up?* »

ABSTRACT

Research on sexual selection has provided growing empirical evidence that many species exhibit non-random mating according to the “genetic compatibility” hypothesis. Females are expected to prefer males possessing alleles that are compatible with their own genetic make-up, based on genome-wide characteristics or on characteristics at specific loci (e.g. the Major Histocompatibility Complex, MHC). Because genes are not directly assessable, they need to be expressed through individual phenotype to influence mate choice. Chemical communication has been suggested as a good candidate to provide information on individual’s genetic make-up and to identify a compatible mate. We tested this prediction in the Alpine marmot (*Marmota marmota*), a cooperatively breeding species, where mate choice is based on genetic characteristics. We sampled anal gland scent of 63 sexually mature Alpine marmots and combined “gas chromatography and mass spectrometry” data with genetic data to test whether anal gland secretion carried information about genetic distance at neutral genetic characteristics (i.e. 16 microsatellites) and at MHC class II proteins for 23 of them. We established a concordance between genetic distance at the neutral genetic characteristics and chemical distance calculated between each dyad of individuals, but not between chemical distance and genetic distance at the MHC class II proteins. To conclude, our results suggest that chemical cues have the potential to act as effective signals for mate assessment in the Alpine marmot.

ADDITIONAL KEYWORDS: gas chromatography-mass spectrometry – genetic compatibility hypothesis – mate assessment – Major Histocompatibility Complex – olfactory cues – relatedness – wild population.

INTRODUCTION

Sexual selection research has provided growing empirical evidence that many species exhibit a non-random mating according to genetic characteristics (Mays & Hill, 2004; Neff & Pitcher, 2005). Females are expected to mate with an appropriate mates to produce high quality offspring (Kokko *et al.*, 2003; Mead & Arnold, 2004). Two non-exclusive hypotheses have been proposed to explain female choice on genetic characteristics.

First, according to the “good genes” hypothesis, females are expected to prefer mates possessing good genes that will be passed on to offspring. The genetic quality of males is then absolute, and males use indicators to signal their quality (e.g. Ditchkoff *et al.*, 2001; Cotton, Fowler, & Pomiankowski, 2004). Indeed, as genes are not directly assessable, they need to be expressed in the phenotype to influence mate choice, and for these signals to be reliable and thus be honest signals, they must be costly to produce (Zahavi, 1975). Good genes may be assessed using sexual ornaments of males that have coevolved with female preference to be extravagant (Houle & Kondrashov, 2002; Hooper & Miller, 2008). These sexually selected traits may be visual, behavioural or acoustic (e.g. the plumage coloration, elongated tails, the courtship behaviour or songs in birds: Møller, 1988; Andersson, 1989; Ballentine, Hyman, & Nowicki, 2004; Hill, 2006; Loyau *et al.*, 2008), or even olfactory (e.g. body scent in mice: Yamazaki *et al.*, 1976; Roberts & Gosling, 2003).

Second, according to the “genetic compatibility” hypothesis (Trivers, 1972; Zeh & Zeh, 1996, 1997), females are expected to prefer males possessing alleles that are compatible with their own genetic make-up (Tregenza & Wedell, 2000). The genetic compatibility is generally measured by the dissimilarity between the genotypes of pair members (Zeh & Zeh, 1996). The genetic compatibility of males is then relative, and based on different forms of genetic compatibility. To avoid the cost of inbreeding (Pusey & Wolf, 1996; Keller & Waller, 2002), females should prefer to mate with males that are genome-wide dissimilar to her (i.e. unrelated males). Nevertheless, it has also been argued that females may choose their mates to favour optimal outbreeding (e.g. Rätti *et al.*, 1995; Bonneaud *et al.*, 2006; Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). In this case, females should avoid males that are

genetically too similar or too dissimilar to their own genetic make-up. When choosing their sexual partners for genetic compatibility, females may also target specific loci (Yamazaki *et al.*, 1976; Milinski, 2006; Eizaguirre *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010; Strandh *et al.*, 2012). In this case, the major histocompatibility complex (MHC) appears as a good candidate because producing heterozygous offspring at the MHC allows offspring to recognize a larger set of pathogens (Penn, Damjanovich, & Potts, 2002; Bernatchez & Landry, 2003). Thus, females should prefer males genetically dissimilar to her at the MHC, and evidence for such a preference is accumulating (Landry *et al.*, 2001; Penn *et al.*, 2002; Milinski, 2003; Thornhill *et al.*, 2003; Shohet & Watt, 2004; Setchell *et al.*, 2010; Strandh *et al.*, 2012; but see Sin *et al.*, 2015).

An intriguing question is to understand how females may evaluate the genetic compatibility of their mates. Because genetic compatibility is not an absolute feature of the male, cues used to advert genetic quality, such as visual (e.g. brightness of feathers, antlers size or coloration) or acoustic (e.g. complexity of song) cues are unlikely to be used to evaluate genetic compatibility. One possibility to favour compatible mates is to avoid mating with familiar individuals that are likely. However, the recognition of unfamiliar kin is challenging (Hurst & Beynon, 2010), and an alternative hypothesis is that olfactory cues provide information on individual genetic make-up (the “odour-genes covariance”, Todrank & Heth, 2003). Recognition of unfamiliar kin may then be done by phenotype matching (e.g. Weisfeld *et al.*, 2003; Gerlach & Lysiak, 2006; Bonadonna & Sanz-Aguilar, 2012). Indeed, recent behavioural studies reported that, in a growing number of species, females are sensitive to these olfactory sources of genetic information and seem to use olfactory cues to approximate their own genotype and those of potential mates, suggesting that chemical communication is a good candidate to identify a compatible mate (reviewed in Johansson & Jones, 2007; Wyatt, 2014). However, the link between vertebrate molecular composition of chemical profiles and genotype is still overlooked (Hurst & Beynon, 2010), and few studies have investigated how odour profile is influenced by individual genetic make-up in non-model vertebrate species (neutral genetic characteristics: Charpentier, Boulet, & Drea, 2008; Liu *et al.*, 2008; Boulet, Charpentier, & Drea, 2009; Leclaire *et al.*, 2012; Morelli *et al.*, 2013; Stoffel *et al.*, 2015 ;

MHC : Knapp, Robson, & Waterhouse, 2006; Setchell *et al.*, 2011; Leclaire *et al.*, 2014; Slade *et al.*, 2016). Moreover, many of these studies have been done on captive animals, and those done on mammals mainly considered primates. So, it is important to add work investigating the link between chemical profile and genetic make-up in non-primate wild animals.

The Alpine marmot is an excellent model to study this question because the choice for genetic compatibility has been evidenced in this species (Cohas *et al.*, 2008; Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). The Alpine marmot is a socially monogamous, territorial species which lives in family groups typically composed of a dominant pair, subordinates of both sexes (sexually mature but non-reproducing and immature individuals) and pups (Allainé, 2000; Allainé *et al.*, 2000). Although dominant males generally successfully monopolize reproduction, extra-pair paternity (EPP) occurs (Goossens *et al.*, 1998; Cohas *et al.*, 2006) and about 8% of offspring are extra-pair young (EPY) and about 14% of litters contain at least one EPY (Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). In the Alpine marmot, the presence and the number of EPY increase when females are paired with genetically too similar or too dissimilar males, suggesting a social mate choice for an optimal genetic similarity (Cohas *et al.*, 2008). Furthermore, the occurrence of EPP and the number of EPY within litters increase with MHC class II protein similarity between social pair members and social pairs show a higher MHC class II protein dissimilarity than expected under random mate choice, suggesting a social mate choice for a MHC class II dissimilarity (Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). All these results support the genetic compatibility hypothesis. The Alpine marmot being monomorphic, and alarm calls being used as a function to warn conspecifics about the presence of a predator (Armitage, 2014), it seems unlikely that visual and acoustic cues are used to evaluate individual's genetic compatibility. Instead, chemical communication seems to be a good candidate to provide information on individual's genetic make-up in this species. Indeed, a previous study suggested that anal gland scent might be involved in intra-sexual competition (Zidat *et al.*, 2018), and behavioural observations supported that chemical communication plays an important role in social behaviours in this species (T.Z., pers. obs.).

Here, we combined gas chromatography and mass spectrometry (GCMS) data with genetic analyses to test whether anal gland secretion may inform on the genetic make-up in the Alpine marmot. First, we evaluated whether the chemical composition of anal gland secretion carried information about genetic distance at the neutral genetic characteristics and at the MHC class II proteins. We predicted that chemical composition of anal gland secretion provides information on neutral genetic characteristics and on specific MCH loci. Then, we investigated the link between genetic distance and chemical distance. We predicted a positive correlation between chemical distance and genetic distance, whether it be for the neutral genetic characteristics or the MHC class II proteins.

MATERIAL AND METHODS

Study species and sampling

We studied a wild population of Alpine marmots located in La Grande Sassi re Natural Reserve located in the French Alps at an elevation of 2340 m. The annual life cycle of the Alpine marmot can be split into two nearly equal periods: the active period and the hibernation. Alpine marmots emerge from hibernation in early April, and the breeding season occurs during the 2 or 3 weeks after emergence (Psenner, 1957). After mating, dominant females gestate for 30 days, and lactate pups in their natal burrows for 40 days; therefore, weaned pups emerge between mid-June and mid-July (Psenner, 1957; Arnold, 1990).

Between mid- May and mid-July 2016, we captured 63 sexually mature Alpine marmots (36 males and 27 females) from 21 family groups. These individuals were both subordinate (aged over two years old), and dominant (at least one of the dominants) individuals of both sexes in each family group. Marmots were captured using two-door live traps baited with dandelions (*Taraxacum densleonis*). Between one and four traps were placed near the main burrows of each territory and each of them were checked every half hour to limit the time spent by a marmot in a trap. Once captured, marmots were transferred in an opaque jute bag (to limit stress) to a field laboratory room where handling occurred. We tranquilized individuals using Zoletil 100 (0.1 mL kg⁻¹), and identified each animal with a transponder and a numbered ear-tag (placed on the right for the females and on the left for the males, for easier identification during field observations). Dominant individuals were also recognizable from a coloured plastic tag attached on the opposite ear. The social status of each adult (dominant *vs* subordinate) was estimated using scrotal development for males and development of teats for females, and we confirmed our assessment by behavioural observations (territorial scent markings: Bel, Porteret, & Coulon, 1995; Bel *et al.*, 1999). Individuals were measured and weighed, and we collected skin biopsies and hair samples for genetic analyses, and anal gland secretions for chemical analyses. The piece of skin (< 1 mm³) was removed with a biopsy punch (Alcyon, Lyon, France) and the scent samples were collected using the same

protocol as described in (Zidat *et al.*, 2018). Briefly, anal glands were cleaned to remove any environmental contaminants and scent secretions were collected by gently squeezing the area around the gland wearing clean nitrile gloves to avoid contamination by human chemicals. We use a solvent extraction method with a mixture of dichloromethane and biphenyl (industrial internal standard). Anal gland secretions were placed into a 1.5 mL opaque chromatographic glass vial and stored at -20 °C in the field, then at -80 °C in the laboratory until GC-MS analysis. In addition, several “field control samples” (i.e. with solvent but without marmot secretions) were collected using the same protocol, to identify potential contaminants.

All handling and sampling were done by T.Z. and S.P., who are authorized for experimentation with animals by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (diploma no. R69UCBLENVL-FI-03 and no. R-13CNRS-FI-10). The protocol was approved by the University of Lyon 1 Ethical Committee (CEEA-55, protocol BH2012-92-VI), and the authorization to capture Alpine marmots was issued by the Préfecture de Savoie (arrêté préfectoral no. 2017/41) after approval by the advisory committee of the Nature Reserve of La Grande Sassièrè.

Chemical analyses and data processing

Gas chromatography–mass spectrometry analysis

All samples were analysed using the GCMS method as detailed in (Zidat *et al.*, 2018). Briefly, an interfaced Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph system equipped with a non-polar DB-5 MS column (30 m long × 0.25 mm internal diameter × 0.25 µm film thickness; Agilent Technologies) coupled with an HP 5973 MDS (mass selective detector) mass spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used with a specific oven temperature programme specifically adjusted for our scent samples, resulting in a total programme time of 39 min (see Zidat *et al.*, 2018 for details).

Chemical analyses

The area of every peak (i.e. integration of the area under the curve) was obtained by an automatic integration with Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (B.07.01 version) and then manually checked to avoid software errors. In addition, we used AMDIS (automated mass spectral deconvolution and identification system) software to control the mass spectrum similarity of peaks between all samples, in order to ascertain peak identification (i.e. the compound of interest) from one individual to another. Furthermore, the internal standard (biphenyl) was used to control instrument drift over time. We found three compounds in all field control samples and scent samples, which were therefore considered as contaminants and removed from the analyses. We also removed compounds found in < 5% of the total individuals (e.g. Harris, Davies, & Nicol, 2012). Then, we calculated the relative abundance of each compound by converting each single peak area into a percentage of the sum of all compound areas for a given individual (i.e. compositional chemical data), and we removed peaks with a relative abundance < 0.05% to exclude background noise (Drea *et al.*, 2013). Finally, as proposed in Hervé, Nicolè, & Lê Cao (2018), we used a centered log ratio transformation of our compositional data using the “*clr*” function in R v. 3.4.3 (R Core Team, 2017) with the addition of a constant (we chose 0.001) to accommodate zero data points, to solve problems of the non-independence of variables and the “constant sum constraint” to 1 or 100% (Aitchison, 1982; Filzmoser, Hron, & Reimann, 2009).

Genetic analyses

Microsatellite & MHC genotyping

The 63 sexually mature individuals were genotyped at 16 microsatellites: SS-Bib1, SS-Bib18, SS-Bib20, SS-Bib31, SS-Bib4 (Klinkicht, 1993); MS41, MS45, MS47, MS53, MS56, MS6, ST10 (Hanslik & Kruckenhauser, 2000); Mao02, Mao18, Mao66, Mao91 (Da Silva *et al.*, 2003) (see Cohas *et al.*, 2008 for details on genotyping methods and microsatellite characteristics).

Twenty-three Alpine marmots were also genotyped at a MHC class II locus (*Mama-DRBI*, leading to polymorphic proteins in this species; Kuduk *et al.*, 2012) using next generation sequencing, Sanger sequencing or were deduced based on mother-father offspring triads (see Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016 for details on genotyping methods and MHC characteristics).

Estimates of the neutral genetic distance

Three estimates of genetic relatedness R between each dyad of individuals were calculated using IDENTIX software (Belkhir, Castric, & Bonhomme, 2002): identity (R_{ID} ; Mathieu *et al.*, 1990), Queller & Goodnight (R_{QG} ; Queller & Goodnight, 1989), and Lynch and Ritland (R_{LR} ; Lynch & Ritland, 1999). Then, these estimates of genetic relatedness were transformed into estimates of genetic distances using the formula: $D = 1 - R$ (to obtain D_{ID} , D_{QG} and D_{LR} , respectively). Because these three estimates of genetic relatedness are relative measures depending on the population's genetic composition, we decided to add an absolute measure of genetic distance, the Shared Allele Distance (D_{AS} ; Chakraborty & Jin, 1993) based on average number of alleles shared between individuals.

Estimate of genetic distance at a specific locus

To investigate the link between genetic distance at a particular functional locus and chemical distance, the distance of the MHC class II proteins produced by each dyad of individuals was estimated over the *Mama-DRBI* locus. This distance was estimated using custom made scripts written in R software as the number of functional proteins an individual produces that differed from the one produced by the other individual of the dyad (Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). The protein translated by the allele *Mama-DRBI*08* was considered non-functional as *Mama-DRBI*08* has a stop codon (Kuduk *et al.*, 2012).

Statistical analyses

First, we tested the concordance between the four neutral genetic distance matrices, two by two, using procrustean co-inertia analysis (PCIA, Dray, Chessel, & Thioulouse, 2003). Then, to test the concordance between genetic distance and chemical distance we used a PCIA to establish whether the pattern found in the chemical distance can be related to the genetic distance because PCIA offers a more powerful alternative to the classical Mantel test (Dray *et al.*, 2003). Briefly, a procrustean co-inertia analysis (PCIA) is an ordination technique that combines the advantages of procrustes analysis (Gower, 1975) and co-inertia analysis (CIA) to find a consensus ordination for two data matrices (Dray *et al.*, 2003). Because a PCIA can only be used when considering individuals x variables matrices and cannot be directly applied on distance matrices, we ordinated the genetic distance matrices by performing a principal coordinate analysis (PCoA), and used the components of the ordination as input variables in PCIA. Furthermore, because our genetic distance matrices did not have Euclidean properties, we added a correction as suggested by Legendre & Anderson (1999), and more recently by Hervé *et al.* (2018). The presence of a concordance between the two datasets (the two PCoAs and then of the two distance matrices) was evaluated by the statistic m^2 , where a value near zero indicates an absence of concordance and a value close to 1 indicates a stronger link between the two matrices. Then, a randomisation test (PROTEST; Jackson, 1995) was carried to test the significance of the concordance between the two distance matrices (Dray *et al.*, 2003). We used the same method as described above to test the concordance between the MHC class II proteins distance and chemical distance. All statistical analyses were performed using R v. 3.4.3 (R Core Team, 2017), with “ade4” for PCIAs and PROTEST tests (*procuste* and *protest* functions; Dray & Dufour, 2007), and the “vegan” package for PCoAs (*dbrda* function; Oksanen *et al.*, 2018).

RESULTS

A total of 76 chemical compounds were detected in scent samples from 63 sexually mature individuals. PCIA performed to test the concordance between the four genetic distance matrices two by two indicated that the four neutral genetic distance matrices were strongly correlated (**Table 3**). These results suggest that the genetic distance calculation based on relatedness and on Shared allele distance produce same results.

Table 3 : Procrustean co-inertia analysis results for concordance test between the four genetic distance matrices realised two by two.

	D _{QG}	D _{LR}	D _{AS}
D _{ID}	$m^2 = 0.97^{***}$	$m^2 = 0.92^{***}$	$m^2 = 0.95^{***}$
D _{QG}	-	$m^2 = 0.94^{***}$	$m^2 = 0.96^{***}$
D _{LR}	-	-	$m^2 = 0.92^{***}$

*** $P < 0.001$.

We found a significant concordance between the chemical distance matrix and the four neutral genetic distance matrices (D_{ID}: $m^2 = 0.30$, $P < 0.05$; D_{QG}: $m^2 = 0.31$, $P < 0.05$; D_{LR}: $m^2 = 0.32$, $P < 0.01$; D_{AS}: $m^2 = 0.31$, $P < 0.05$). The PCIA indicated that individuals were more divergent for the genetic profiles than for the chemical data (**Fig.26**).

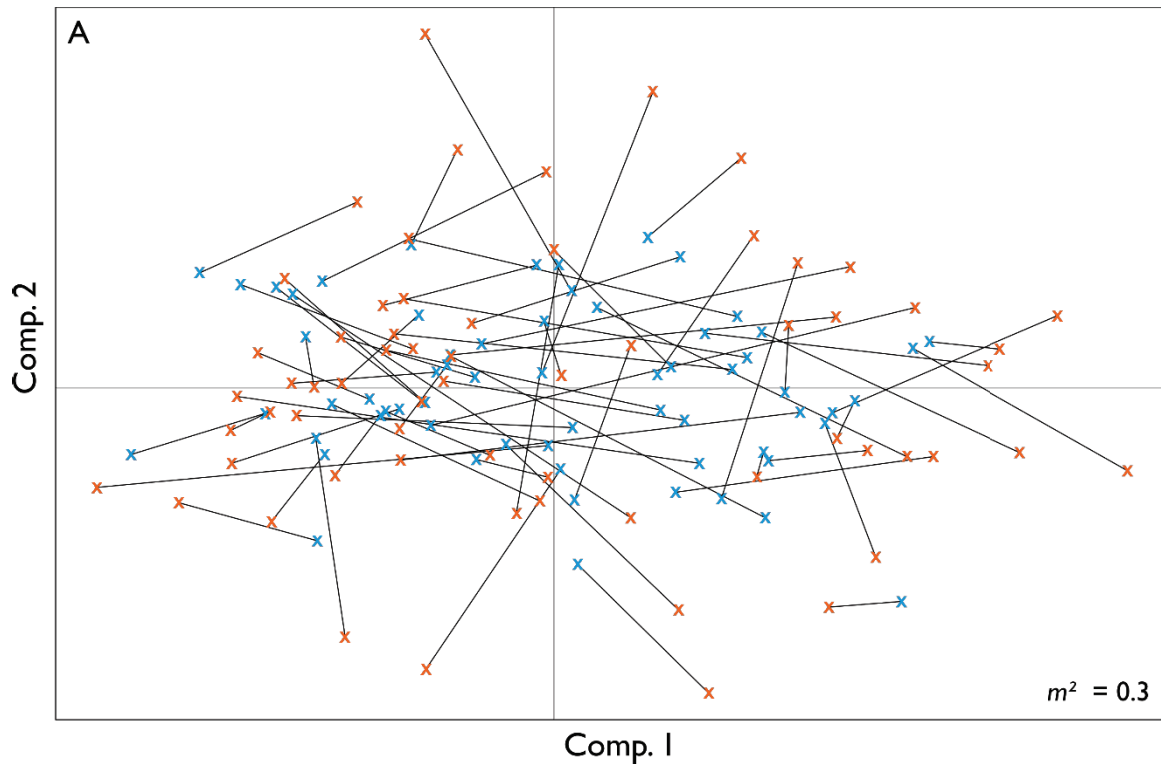


Figure 26 : Concordance between chemical distance (blue crosses) and neutral genetic distance based on Queller & Goodnight relatedness (orange crosses). Each pair of crosses corresponds to an individual, and line segments are residuals between scores obtained from the chemical matrix and the genetic matrix. The m^2 statistic are indicated.

When considering the 23 individuals genotyped at the MHC class II locus *Mama-DRBI*, seven of the 76 chemical compounds were no longer present. The PCIA performed on chemical distance and MHC class II proteins distance matrices revealed no significant concordance between the two matrices ($m^2 = 0.49$, $P = 0.14$).

DISCUSSION

We investigated whether odours may encode both relatedness and MHC genotype information, and we found that the chemical composition of anal gland secretions encoded genetic relatedness but not MHC class II proteins information in sexually mature Alpine marmots.

Chemical composition and relatedness

Kin recognition may play an important role in mate choice to avoid inbreeding or to choose genetically compatible mates (Mays & Hill, 2004). Olfaction has been proven to be implicated in the recognition of kin and compatible mates (Penn, 2002; Mateo, 2003; Johansson & Jones, 2007). Indeed, evidence that semiochemical profiles may inform on relatedness is growing but still scarce, in particular in wild conditions. A correlation between semiochemical profiles and relatedness has been found in both birds (Leclaire *et al.*, 2012; Potier *et al.*, 2018) and mammals (giant panda *Ailuropoda melanoleuca*, Liu *et al.*, 2008; Antarctic fur seal *Arctocephalus gazella*, Stoffel *et al.*, 2015; rodents, Sun & Müller-Schwarze, 1998; Zhang & Zhang, 2011; and particularly in primates, ring-tailed lemur *Lemur catta*, Charpentier *et al.*, 2008; Boulet *et al.*, 2009; Milne-Edwards' sifaka *Propithecus edwardsi*, Morelli *et al.*, 2013). In the Alpine marmot, previous studies have shown that dominant males are cuckolded when they are too genetically similar or too genetically dissimilar to them (Cohas *et al.*, 2008; Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). This supports the genetic compatibility hypothesis and suggests that females prefer to mate with males optimally dissimilar to them. By evidencing a significant concordance between chemical distance and relatedness, our results indicate that anal scent may inform on individual's genetic make-up, and that female Alpine marmots may use olfactory cues to choose their mates for genetic benefits (i.e. to avoid both inbreeding and outbreeding depression). Moreover, in the Alpine marmot, extra-pair paternity occurs (Goossens *et al.*, 1998), and the dominant males are sometime cuckolded by subordinate males from their own family groups. However, in all these cases, those subordinate males were not related to the dominant female indicating that females are able to recognise unrelated familiar individuals (Cohas *et al.*, 2006). Then, female Alpine marmots do not rely on familiarity

to recognise non-kin, and our results suggest olfactory cues may allow such a recognition through self-referent phenotypic matching (Hauber & Sherman, 2001).

Many studies have highlighted that chemical distance and genetic distance were positively correlated only during the breeding season (e.g. Charpentier *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Boulet *et al.*, 2009; Potier *et al.*, 2018). This may be explained because the breeding season represents a period of change in secretory glands and their olfactory signals, a phenomenon typically attributed to the up-regulation of sex steroids (Ebling, 1977; Albone, 1984; Müller-Schwarze, 2006). Interestingly, although anal gland secretions were collected just after the mating season, we found that the concordance between chemical distance and genetic distance was still present. This suggests that kin recognition is used in another context than mate choice. Kin recognition is a key attribute of kin selection (Hamilton, 1964) by allowing nepotism. In particular, a higher level of relatedness within group members than among groups sets the condition for kin selection to promote cooperation between group members (Van Horn *et al.*, 2004). Year-round kin recognition is thus likely needed in a cooperative breeder such as the Alpine marmot where helpers (male subordinates) warm related juveniles during winter (i.e. social thermoregulation during hibernation; Arnold, 1993; Allainé *et al.*, 2000). Moreover, such a year-round kin recognition favour cooperation between group members to exclude any stranger that enters the family territory to challenge the same-sex dominant or to seek mating opportunities (TZ and DA, pers. obs.).

Chemical composition and MHC class II protein distance

Research on sexual selection has provided a growing body of empirical evidence for non-random mating based on MHC characteristics in many species (e.g. birds: Freeman-Gallant *et al.*, 2003; Juola & Dearborn, 2012; Strandh *et al.*, 2012; mammals: Chaix, Cao, & Donnelly, 2008; Setchell *et al.*, 2010; fishes: Landry *et al.*, 2001; Forsberg *et al.*, 2007). Females are expected to prefer mates that are more genetically compatible than the alternatives to enhance offspring fitness by creating favourable combinations of the maternal and paternal genes (Tregenza & Wedell, 2000). A preference for MHC dissimilar males is expected because producing heterozygous offspring at the MHC allows

offspring to recognize a larger set of pathogens and parasites (Penn *et al.*, 2002; Milinski, 2006). As expected, females are often reported to prefer MHC-dissimilar partners (see Kamiya *et al.*, 2014 for a review) although preference for MHC-similar males was also noticed (e.g. Bonneaud *et al.*, 2006; Schwensow *et al.*, 2008; Bollmer *et al.*, 2012; Sin *et al.*, 2015).

Although MHC genotypes can be assessed from visual cues (von Schantz *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 2012), evidence accumulated since the mid-1970s indicates that MHC genes influence individual odours (e.g. Yamazaki *et al.*, 1976; Wedekind *et al.*, 1995; Penn & Potts, 1998; Penn, 2002; Milinski, 2006; Eizaguirre *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010; Ziegler, 2013). However, only few studies have yet revealed a link between chemical composition of scent and MHC genotype (Knapp *et al.*, 2006; Setchell *et al.*, 2011; Leclaire *et al.*, 2014; Slade *et al.*, 2016). In the Alpine marmot, mate choice for MHC dissimilar partners has been described (Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016), and that extra-pair young seem to better survive and access to dominance status (Cohas *et al.*, 2007). Contrary to our prediction, we did not find a correlation between chemical distance and distance of the MHC class II proteins. This lack of concordance between MHC genotype and odour may be explained in several ways. First, our analysis may suffer from a low statistical power due to a too small sample size. Second, it is possible that the concordance may occur only during the breeding season. Indeed, there may be no need to signal MHC genotype year-round if MHC odour-based is only used for mate choice contrary to the need for year-round kin recognition as discussed above. In two of the few studies having revealed a link between chemical composition of scent and MHC genotype, odour samples were collected during the mating season (Leclaire *et al.*, 2014; Slade *et al.*, 2016). Third, the odour samples were not collected from the right source. How the MHC genes influence individual odour and thus mating preference is still not clear (Penn, 2002; Restrepo *et al.*, 2006). Individual odourtypes are the product of complex interactions between MHC and other genes (Eggert *et al.*, 1996; Willse *et al.*, 2006; Novotny *et al.*, 2007), and there are several ways for MHC genes to influence odour (Penn & Potts, 1998). For example, in mice, MHC-related odour are generally found in urine as Major Urinary Protein (MUP; e.g. Singer, Beauchamp, & Yamazaki, 1997; Leinders-Zufall *et al.*, 2004; Hurst, 2009). It is

then likely that anal gland secretions we collected on Alpine marmots do not encode for MHC genotype, and that other glands should be considered.

Conclusion

Our results suggest that chemical cues have the potential to act as effective signals for mate assessment in the Alpine marmot by informing opposite sex individuals of own genetic characteristics. Thus, our study seems to support the existence of a sophisticated odour-based mechanisms of mate choice in vertebrates thus contributing to an increasing body of evidence suggesting that odour cues play an important role in communication in animals. However, whether Alpine marmots use odour cues to choose their mates still needs to be validated by behavioural experiments.

REFERENCES

- Aitchison J. 1982. The statistical analysis of compositional data. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **44**: 139–177.
- Albone ES. 1984. *Mammalian Semiochemistry*. New York: John Wiley.
- Allainé D. 2000. Sociality, mating system and reproductive skew in marmots: evidence and hypotheses. *Behavioural Processes* **51**: 21–34.
- Allainé D, Brondex F, Graziani L, Coulon J, Till-Bottraud I. 2000. Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behavioral Ecology* **11**: 507–514.
- Andersson S. 1989. Sexual selection and cues for female choice in leks of Jackson's widowbird *Euplectes jacksoni*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **25**: 403–410.
- Armitage KB. 2014. *Marmot biology: sociality, individual fitness, and population dynamics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Arnold W. 1990. The evolution of marmot sociality. I. Why disperse late? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **27**: 229–237.
- Arnold W. 1993. Energetics of social hibernation. In: Carey C, Florant GL, Wunder BA, Horwitz B, eds. *Life in the cold: ecological, physiological, and molecular mechanisms*. Boulder: Westview Press, 65–80.
- Ballentine B, Hyman J, Nowicki S. 2004. Vocal performance influences female response to male bird song: an experimental test. *Behavioral Ecology* **15**: 163–168.
- Bel MC, Coulon J, Sreng L, Allainé D, Bagnères AG, Clément JL. 1999. Social signals involved in scent-marking behavior by cheek-rubbing in Alpine marmots (*Marmota marmota*). *Journal of Chemical Ecology* **25**: 2267–2293.
- Bel MC, Porteret C, Coulon J. 1995. Scent deposition by cheek rubbing in the alpine marmot (*Marmota marmota*) in the French Alps. *Canadian Journal of Zoology* **73**: 2065–2071.
- Belkhir K, Castric V, Bonhomme F. 2002. IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes* **2**: 611–614.
- Bernatchez L, Landry C. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 363–377.
- Bollmer JL, Dunn PO, Freeman-Gallant CR, Whittingham LA. 2012. Social and extra-pair mating in relation to major histocompatibility complex variation in common yellowthroats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 4778–4785.
- Bonadonna F, Sanz-Aguilar A. 2012. Kin recognition and inbreeding avoidance in wild birds: the first evidence for individual kin-related odour recognition. *Animal Behaviour* **84**: 509–513.

- Bonneaud C, Chastel O, Federici P, Westerdahl H, Sorci G. 2006. Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 1111–1116.
- Boulet M, Charpentier MJ, Drea CM. 2009. Decoding an olfactory mechanism of kin recognition and inbreeding avoidance in a primate. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 281.
- Chaix R, Cao C, Donnelly P. 2008. Is mate choice in Humans MHC-dependent? *PLoS Genetics* **4**: e1000184.
- Chakraborty R, Jin L. 1993. A unified approach to study hypervariable polymorphisms: Statistical considerations of determining relatedness and population distances. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ, eds. *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Basel: Birkhäuser Basel, 153–175.
- Charpentier MJE, Boulet M, Drea CM. 2008. Smelling right: the scent of male lemurs advertises genetic quality and relatedness. *Molecular Ecology* **17**: 3225–3233.
- Cohas A, Bonenfant C, Gaillard JM, Allainé D. 2007. Are extra-pair young better than within-pair young? A comparison of survival and dominance in Alpine marmot. *Journal of Animal Ecology* **76**: 771–781.
- Cohas A, Yoccoz NG, Bonenfant C, Goossens B, Genton C, Galan M, Kempenaers B, Allainé D. 2008. The genetic similarity between pair members influences the frequency of extrapair paternity in alpine marmots. *Animal Behaviour* **76**: 87–95.
- Cohas A, Yoccoz NG, Da Silva A, Goossens B, Allainé D. 2006. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot (*Marmota marmota*): the roles of social setting and female mate choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59**: 597–605.
- Cotton S, Fowler K, Pomiankowski A. 2004. Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **271**: 771–783.
- Da Silva A, Luikart G, Allaine D, Gautier P, Taberlet P, Pompanon F. 2003. Isolation and characterization of microsatellites in European alpine marmots (*Marmota marmota*). *Molecular Ecology Notes* **3**: 189–190.
- Ditchkoff SS, Lochmiller RL, Masters RE, Hoofer SR, Bussche RAVD. 2001. Major Histocompatibility Complex-associated variation in secondary sexual traits of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): evidence for good-genes advertisement. *Evolution* **55**: 616–625.
- Dray S, Chessel D, Thioulouse J. 2003. Procrustean co-inertia analysis for the linking of multivariate datasets. *Écoscience* **10**: 110–119.
- Dray S, Dufour AB. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**: 1–20.

- Drea CM, Boulet M, Delbarco-Trillo J, Greene LK, Sacha CR, Goodwin TE, Dubay GR. 2013. The “secret” in secretions: methodological considerations in deciphering primate olfactory communication. *American Journal of Primatology* **75**: 621–642.
- Dunn PO, Bollmer JL, Freeman-Gallant CR, Whittingham LA. 2012. MHC variation is related to a sexually selected ornament, survival, and parasite resistance in common yellowthroats. *Evolution* **67**: 679–687.
- Ebling FJ. 1977. Hormonal control of mammalian skin glands. In: Müller-Schwarze D, Mozell MM, eds. *Chemical Signals in Vertebrates*. New York: Plenum Press, 17–33.
- Eggert F, Höller C, Luszyk D, Müller-Ruchholtz W, Ferstl R. 1996. MHC-associated and MHC-independent urinary chemosignals in mice. *Physiology & Behavior* **59**: 57–62.
- Eizaguirre C, Yeates SE, Lenz TL, Kalbe M, Milinski M. 2009. MHC-based mate choice combines good genes and maintenance of MHC polymorphism. *Molecular Ecology* **18**: 3316–3329.
- Ferrandiz-Rovira M, Allainé D, Callait-Cardinal MP, Cohas A. 2016. Mate choice for neutral and MHC genetic characteristics in Alpine marmots: different targets in different contexts? *Ecology and Evolution* **6**: 4243–4257.
- Filzmoser P, Hron K, Reimann C. 2009. Univariate statistical analysis of environmental (compositional) data: problems and possibilities. *Science of the Total Environment* **407**: 6100–6108.
- Forsberg LA, Dannewitz J, Petersson E, Grahn M. 2007. Influence of genetic dissimilarity in the reproductive success and mate choice of brown trout-females fishing for optimal MHC dissimilarity. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 1859–1869.
- Freeman-Gallant CR, Meguerdichian M, Wheelwright NT, Sollecito SV. 2003. Social pairing and female mating fidelity predicted by restriction fragment length polymorphism similarity at the major histocompatibility complex in a songbird. *Molecular Ecology* **12**: 3077–3083.
- Gerlach G, Lysiak N. 2006. Kin recognition and inbreeding avoidance in zebrafish, *Danio rerio*, is based on phenotype matching. *Animal Behaviour* **71**: 1371–1377.
- Goossens B, Graziani L, Waits LP, Farand E, Magnolon S, Coulon J, Bel MC, Taberlet P, Allainé D. 1998. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **43**: 281–288.
- Gower JC. 1975. Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* **40**: 33–51.
- Hamilton WD. 1964. The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of Theoretical Biology* **7**: 17–52.
- Hanslik S, Kruckenhauser L. 2000. Microsatellite loci for two European sciurid species (*Marmota marmota*, *Spermophilus citellus*). *Molecular Ecology* **9**: 2163–2165.
- Harris RL, Davies NW, Nicol SC. 2012. Chemical composition of odorous secretions in the Tasmanian short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus setosus*). *Chemical Senses* **37**: 819–836.

- Hauber ME, Sherman PW. 2001. Self-referent phenotype matching: theoretical considerations and empirical evidence. *Trends in Neurosciences* **24**: 609–616.
- Hervé MR, Nicolè F, Lê Cao KA. 2018. Multivariate analysis of multiple datasets: a practical guide for chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology* **44**: 215–234.
- Hill GE. 2006. Female mate choice for ornamental coloration. In: Hill GE, McGraw KJ, eds. *Bird Coloration: Function and Evolution*. Cambridge: Harvard University Press, 137–200.
- Hooper PL, Miller GF. 2008. Mutual mate choice can drive costly signaling even under perfect monogamy. *Adaptive Behavior* **16**: 53–70.
- Houle D, Kondrashov AS. 2002. Coevolution of costly mate choice and condition-dependent display of good genes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **269**: 97–104.
- Hurst JL. 2009. Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural Brain Research* **200**: 295–303.
- Hurst JL, Beynon RJ. 2010. Making progress in genetic kin recognition among vertebrates. *Journal of Biology* **9**: 13.
- Jackson DA. 1995. PROTEST: A PROcrustean Randomization TEST of community environment concordance. *Écoscience* **2**: 297–303.
- Johansson BG, Jones TM. 2007. The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews* **82**: 265–289.
- Juola FA, Dearborn DC. 2012. Sequence-based evidence for major histocompatibility complex-disassortative mating in a colonial seabird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 153–162.
- Kamiya T, O'Dwyer K, Westerdahl H, Senior A, Nakagawa S. 2014. A quantitative review of MHC-based mating preference: the role of diversity and dissimilarity. *Molecular Ecology* **23**: 5151–5163.
- Keller LF, Waller DM. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 230–241.
- Klinkicht M. 1993. PhD. Thesis. Untersuchungen zum Paarungssystem des Alpenmurmeltiers, *Marmota marmota* mittels DAN Fingerprinting.
- Knapp LA, Robson J, Waterhouse JS. 2006. Olfactory signals and the MHC: a review and a case study in *Lemur catta*. *American Journal of Primatology* **68**: 568–584.
- Kokko H, Brooks R, Jennions MD, Morley J. 2003. The evolution of mate choice and mating biases. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**: 653–664.
- Kuduk K, Johanet A, Allainé D, Cohas A, Radwan J. 2012. Contrasting patterns of selection acting on MHC class I and class II DRB genes in the Alpine marmot (*Marmota marmota*): *Journal of Evolutionary Biology* **25**: 1686–1693.

- Landry C, Garant D, Duchesne P, Bernatchez L. 2001. 'Good genes as heterozygosity': the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **268**: 1279–1285.
- Leclaire S, van Dongen WFD, Voccia S, Merklings T, Ducamp C, Hatch SA, Blanchard P, Danchin E, Wagner RH. 2014. Preen secretions encode information on MHC similarity in certain sex-dyads in a monogamous seabird. *Scientific Reports* **4**: 6920.
- Leclaire S, Merklings T, Raynaud C, Mulard H, Bessiere JM, Lhuillier E, Hatch SA, Danchin E. 2012. Semiochemical compounds of preen secretion reflect genetic make-up in a seabird species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 1185–1193.
- Legendre P, Anderson MJ. 1999. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* **69**: 1–24.
- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, Chandramani P, Maul-Pavicic A, Jäger M, Li XH, Breer H, Zufall F, Boehm T. 2004. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* **306**: 1033–1037.
- Liu D, Wei R, Zhang G, Yuan H, Wang Z, Sun L, Zhang J, Zhang H. 2008. Male panda (*Ailuropoda melanoleuca*) urine contains kinship information. *Science Bulletin* **53**: 2793–2800.
- Loyau A, Petrie M, Saint Jalme M, Sorci G. 2008. Do peahens not prefer peacocks with more elaborate trains? *Animal Behaviour* **76**: e5–e9.
- Lynch M, Ritland K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* **152**: 1753–1766.
- Mateo JM. 2003. Kin recognition in ground squirrels and other rodents. *Journal of Mammalogy* **84**: 1163–1181.
- Mathieu E, Autem M, Roux M, Bonhomme F. 1990. Épreuves de validation dans l'analyse de structures génétiques multivariées : comment tester l'équilibre panmictique ? *Revue de statistique appliquée* **38**: 47–66.
- Mays HL, Hill GE. 2004. Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 554–559.
- Mead LS, Arnold SJ. 2004. Quantitative genetic models of sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 264–271.
- Milinski M. 2003. The function of mate choice in sticklebacks: optimizing Mhc genetics*. *Journal of Fish Biology* **63**: 1–16.
- Milinski M. 2006. The Major Histocompatibility Complex, sexual selection, and mate choice. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **37**: 159–186.
- Møller AP. 1988. Female choice selects for male sexual tail ornaments in the monogamous swallow. *Nature* **332**: 640–642.
- Morelli TL, Hayes RA, Nahrung HF, Goodwin TE, Harelimana IH, MacDonald LJ, Wright PC. 2013. Relatedness communicated in lemur scent. *Naturwissenschaften* **100**: 769–777.

- Müller-Schwarze D. 2006. *Chemical Ecology of Vertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Neff BD, Pitcher TE. 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology* **14**: 19–38.
- Novotny MV, Soini HA, Koyama S, Wiesler D, Bruce KE, Penn DJ. 2007. Chemical identification of MHC-influenced volatile compounds in mouse urine. I: Quantitative proportions of major chemosignals. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 417–434.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2018. *vegan*: community ecology package. R package version 2.4-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Penn DJ. 2002. The scent of genetic compatibility: sexual selection and the Major Histocompatibility Complex. *Ethology* **108**: 1–21.
- Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK. 2002. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 11260–11264.
- Penn D, Potts WK. 1998. Untrained mice discriminate MHC-determined odors. *Physiology & Behavior* **64**: 235–243.
- Potier S, Besnard MM, Schikorski D, Buatois B, Duriez O, Gabirot M, Leclaire S, Bonadonna F. 2018. Preen oil chemical composition encodes individuality, seasonal variation and kinship in black kites *Milvus migrans*. *Journal of Avian Biology* **49**: e01728.
- Psenner H. 1957. Neues vom Murmeltier, *Marmota m. marmota* (Linne 1758). *Säugetierk. Mitt.* **5**: 4–10.
- Pusey A, Wolf M. 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 201–206.
- Queller DC, Goodnight KF. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**: 258–275.
- R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>.
- Rätti O, Hovi M, Lundberg A, Tegelström H, Alatalo RV. 1987. Extra-pair paternity and male characteristics in the pied flycatcher. *37*: 419–425.
- Restrepo D, Lin W, Salcedo E, Yamazaki K, Beauchamp G. 2006. Odortypes and MHC peptides: complementary chemosignals of MHC haplotype? *TRENDS in Neurosciences* **29**: 604–609.
- Roberts SC, Gosling LM. 2003. Genetic similarity and quality interact in mate choice decisions by female mice. *Nature Genetics* **35**: 103–106.
- von Schantz T, Wittzell H, Göransson G, Grahn M. 1997. Mate choice, male condition-dependent ornamentation and MHC in the pheasant. *Hereditas* **127**: 133–140.

- Schwensow N, Fietz J, Dausmann K, Sommer S. 2008. MHC-associated mating strategies and the importance of overall genetic diversity in an obligate pair-living primate. *Evolutionary Ecology* **22**: 617–636.
- Setchell JM, Charpentier MJE, Abbott KM, Wickings EJ, Knapp LA. 2010. Opposites attract: MHC-associated mate choice in a polygynous primate. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 136–148.
- Setchell JM, Vaglio S, Abbott KM, Moggi-Cecchi J, Boscaro F, Pieraccini G, Knapp LA. 2011. Odour signals major histocompatibility complex genotype in an Old World monkey. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**: 274–280.
- Shohet AJ, Watt PJ. 2004. Female association preferences based on olfactory cues in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **55**: 363–369.
- Sin YW, Annavi G, Newman C, Buesching C, Burke T, Macdonald DW, Dugdale HL. 2015. MHC class II-assortative mate choice in European badgers (*Meles meles*). *Molecular Ecology* **24**: 3138–3150.
- Singer AG, Beauchamp GK, Yamazaki K. 1997. Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 2210–2214.
- Slade JW, Watson MJ, Kelly TR, Gloor GB, Bernards MA, MacDougall-Shackleton EA. 2016. Chemical composition of preen wax reflects major histocompatibility complex similarity in songbirds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**: 20161966.
- Stoffel MA, Caspers BA, Forcada J, Giannakara A, Baier M, Eberhart-Phillips L, Müller C, Hoffman JL. 2015. Chemical fingerprints encode mother–offspring similarity, colony membership, relatedness, and genetic quality in fur seals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: E5005–E5012.
- Strandh M, Wester Dahl H, Pontarp M, Canback B, Dubois MP, Miquel C, Taberlet P, Bonadonna F. 2012. Major Histocompatibility Complex class II compatibility, but not class I, predicts mate choice in a bird with highly developed olfaction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 4457–4463.
- Sun L, Müller-Schwarze D. 1998. Anal gland secretion codes for relatedness in the beaver, *Castor canadensis*. *Ethology* **104**: 917–927.
- Thornhill R, Gangestad SW, Miller R, Scheyd G, McCollough JK, Franklin M. 2003. Major histocompatibility complex genes, symmetry, and body scent attractiveness in men and women. *Behavioral Ecology* **14**: 668–678.
- Todrank J, Heth G. 2003. Odor–genes covariance and genetic relatedness assessments: rethinking odor-based “recognition” mechanisms in rodents. *Advances in the Study of Behavior* **32**: 77–130.
- Tregenza T, Wedell N. 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Molecular Ecology* **9**: 1013–1027.

- Trivers RL. 1972.** Parental investment and sexual selection. In: Campbell BG, eds. *Sexual Selection and the Descent of Man*. Chicago: Aldine, 136-207.
- Van Horn RC, Engh AL, Scribner KT, Funk SM, Holekamp KE. 2004.** Behavioural structuring of relatedness in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*) suggests direct fitness benefits of clan-level cooperation. *Molecular Ecology* **13**: 449-458.
- Wedekind C, Seebeck T, Bettens F, Paepke AJ. 1995.** MHC-dependant mate preferences in humans. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **260**: 245-249.
- Weisfeld GE, Czilli T, Phillips KA, Gall JA, Lichtman CM. 2003.** Possible olfaction-based mechanisms in human kin recognition and inbreeding avoidance. *Journal of Experimental Child Psychology* **85**: 279-295.
- Willse A, Kwak J, Yamazaki K, Preti G, Wahl JH, Beauchamp GK. 2006.** Individual odortypes: interaction of MHC and background genes. *Immunogenetics* **58**: 967-982.
- Wyatt TD. 2014.** *Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signatures*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Yamazaki K, Boyse EA, Miké V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA, Thomas L. 1976.** Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *Journal of Experimental Medicine* **144**: 1324-1335.
- Zahavi A. 1975.** Mate selection - A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* **53**: 205-214.
- Zeh JA, Zeh DW. 1996.** The evolution of polyandry I: Intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proceedings: Biological Sciences* **263**: 1711-1717.
- Zeh JA, Zeh DW. 1997.** The evolution of polyandry II: Post-copulatory defences against genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **264**: 69-75.
- Zhang YH, Zhang JX. 2011.** Urine-derived key volatiles may signal genetic relatedness in male rats. *Chemical Senses* **36**: 125-135.
- Zidat T, Dufour AB, Meiffren G, Gabirot M, Comte G, Allainé D. 2018.** Anal scent gland secretions inform on sexual maturity, sex and social status in the Alpine marmot, *Marmota marmota* (Rodentia: Sciuridae): a role in intrasexual competition in cooperative breeders? *Biological Journal of the Linnean Society* **125**: 229-239.
- Ziegler TE. 2013.** Social effects via olfactory sensory stimuli on reproductive function and dysfunction in cooperative breeding marmosets and tamarins. *American Journal of Primatology* **75**: 202-211.

Chapitre 4

COMMUNICATION CHIMIQUE

&

RELATION ENTRE GROUPES

Chapitre 4

ARTICLE 3:

Neighborhood bully: no conspecific intruder is welcome in Alpine marmot's families.

Mariona Ferrandiz-Rovira, **Timothée Zidat**, Vérane Berger, Pierre Dupont,
Célia Rézouki & Aurélie Cohas

Soumis à *Behavioral Ecology*



© Carole et Denis Favre-Bonvin

ABSTRACT

Territorial animals are expected to respond with lower aggressivity to intrusions by neighbours already possessing a territory than by strangers that may fight to evict them, a behaviour known as the dear enemy phenomenon. In social species, the hierarchy between individuals might mediate these aggressive responses depending on the intruder's social status. These adjustment of behaviours presupposes a capacity to discriminate between individuals posing different threat levels. Here, we tested the behavioural response of Alpine marmots to territorial intrusions by different intruders in a wild population of the cooperatively breeding Alpine marmot (*Marmota marmota*). We subjected both male and female dominants to two two-way choice experiments where we compared their response to orbital gland secretions from neighbour and stranger dominant males (i.e. dear enemy phenomenon) and to dominant or subordinate male strangers (i.e. social status-specific response). We further tested for an encryption of social status in scents by comparing chemical profiles of orbital gland secretions of both dominant and subordinate males. We showed that dominant marmots do not adjust their exploratory or aggressive behaviours according to the geographical origin (i.e. neighbours or strangers) or the social status of intruders even though dominants and subordinates are thought to pose different threats and social status is encoded in orbital gland secretions. We conclude that in dominant Alpine marmots no intruders are welcome. Research taking a more holistic approach of the evolution and maintenance of territoriality is now required to understand the flexibility of responses towards intruders in group-living species.

ADDITIONAL KEYWORDS: chemical communication – cooperative breeding – dear enemy phenomenon – dominant-subordinate discrimination – odour cues – scent marking.

INTRODUCTION

Territoriality is often defined as the defence of an area in order to secure access to crucial resources, including food, shelter and/or mates (Maher & Lott, 1995). Territory owners typically use deterrent signals (e.g. acoustic, visual or olfactory signalization) to discourage potential intruders but, when these signals are not enough, physical exclusions may take place (e.g. chases and fights). Such active defence of the territory can be very costly as it may lead to injuries or even death (Bradbury & Vehrencamp, 2011). To decrease these costs, some individuals can adjust their response to the level of threat an intruder represents. The perceived threat can depend on the intruder's geographical origin (i.e. neighbour or stranger), its individual characteristics (e.g. sex, social status), or the location and timing of the intrusion (Christensen & Radford, 2018; McGregor & Bee, 2018; Radford & Christensen, 2018). But if the intruders' characteristics are of crucial importance, the territory owners' characteristics (e.g. sex, social status) also matter (Christensen & Radford, 2018).

Neighbours are commonly considered as less likely to enter adjacent territories with taking-over prospects (Gosling & McKay, 1990; Temeles, 1994; Müller & Manser, 2007) and territory owners may reduce their active defence behaviours towards known neighbours, once common boundaries have been established (Gosling & McKay, 1990; Temeles, 1994). By opposition, strangers (i.e. unknown individuals) may be looking to usurp a territory, thus representing a potentially higher threat to be answered aggressively. This lower level of response towards neighbours than strangers is known as the dear enemy phenomenon (Temeles, 1994).

Studies on the topic provided many examples of the dear enemy phenomenon in invertebrates (Heinze *et al.*, 1996; Booksmythe, Jennions, & Backwell, 2010), birds (Stoddard *et al.*, 1990; Moser-Purdy & Mennill, 2016) and mammals (Rosell & Bjørkøyli, 2002; Palphramand & White, 2007). However, it has recently been acknowledged that, depending on the context, neighbours may represent a greater threat than strangers and thus favour an inverse behavioural response with higher aggressiveness towards neighbours than strangers, as predicted by the nasty

neighbour effect (Müller & Manser, 2007). Additionally, in territorial social species, the existence of a hierarchy between individuals may mediate the behavioural response of an individual according to the intruders' social status (Christensen & Radford, 2018). Whereas subordinates are most likely waiting for any opportunity to usurp a territory and become dominant, dominants devote much of their time to the defence of their own territory (Lardy *et al.*, 2011). Subordinates should therefore represent a higher threat than dominants to other dominants. However, relatively few studies accounted for the social status of tested individuals when studying the dear enemy phenomenon (**Table 4**).

An adjustment of the behavioural response to an intruder presupposes the ability for individuals to discriminate between individuals posing different levels of threat, i.e. neighbours *vs* strangers and/or subordinates *vs* dominants (Höjesjö *et al.*, 1998; Aragon, López, & Martín, 2000). One way to discriminate neighbours from strangers is by learning to recognize neighbours identities and identifying unknown intruders by contrast (Gheusi, Goodall, & Dantzer, 1997; Johnston & Bullock, 2001). This type of discrimination between neighbours and strangers may be facilitated in species with stable territories where encounters with neighbours are repeated in time (Stoddard *et al.*, 1990; Rosell & Bjørkøyli, 2002).

Scientific name	Sociality ^a	Scent source	Dear enemy phenomenon			Additional discrimination			Chemical signature	References
			N _b	Interest ^c	Aggressivness ^d	N _b	Test	Response ^e		
Rodentia										
<i>Marmota marmota</i>	Cooperative breeder ₁	Orbital gland	127 / 86	NO (no differences)	NO (no differences)	16 / 11	Dominant vs subordinate	NO / NO	YES	<i>This study</i>
<i>Marmota monax</i>	Solitary ₁	Buccal gland	32	YES	NO	-	-	-	-	Meier 1991
		Buccal gland	-	-	-	19	Future social status	YES	-	Hébert and Barrette 1989
<i>Marmota flaviventris</i>	Matrilines ₂	Anal gland	15 / 1	NO (no differences)	NA	-	-	-	-	Cross et al. 2013
<i>Castor canadensis</i>	Cooperative breeders ₃	Castoreum	97 / 49	YES	YES	-	-	-	-	Schulte 1998
		Castoreum	-	-	-	13	Adult vs subadult	NO	-	Herr et al. 2006
<i>Castor fiber</i>	Cooperative breeders ₃	Castoreum and anal gland	38 / 35	YES	YES	-	-	-	-	Rosell and Bjørkøyli 2002
		Anal gland	-	-	-	22 / 19	Dominant vs subordinate	YES	YES	Tinnesand et al. 2013
<i>Ctenomys talarum</i>	Solitary ₄	Urine and faeces	90 / 45	YES	YES	-	-	-	-	Zenuto 2010
<i>Urocitellus columbianus</i>	Matrilines ₅	Oral gland	88 / 53	YES	YES	-	-	-	-	Harris and Murie 1982
		Oral gland	48	YES	NO (no differences)	26	Kin vs non-kin	YES	-	Raynaud and Dobson 2011
Carnivora										
<i>Meles meles</i>	Communal breeders ₃	Faeces	93 / 8	YES	NA	-	-	-	-	Palphramand and White 2007
		Anal gland	197 / 141	YES	YES	351	Sex and age	YES	-	Tinnesand et al. 2015
		Anal gland	-	-	-	-	-	-	YES	Buesching and Jordan 2018
<i>Mungos mungo</i>	Communal breeders ₃	Urine and faeces	142 / 70	NO (nasty neighbor)	NO (nasty neighbor)	-	-	-	-	Müller and Manser 2007
<i>Helogale parvula</i>	Cooperative breeders ₃	Faeces	13	NO (no differences)	NO (no differences)	-	-	-	-	Christensen et al. 2016
Lagomorpha										
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Plural breeders ₆	Faeces	152	-	YES	-	-	-	-	Monclus et al. 2014

Table 4 : Empirical studies investigating the dear enemy phenomenon using scents in mammals with different sociality levels and testing for additional discrimination and chemical signature of the scents.

a References for the sociality levels: **1.** Allainé, 2000; **2.** Blumstein *et al.*, 2004; **3.** Lukas & Clutton-Brock, 2012; **4.** Zenuto, 2010; **5.** King, 1989; **6.** Isler & van Schaik, 2012.

b Number of trials with an actual response involving signs of interests (e.g. sniffing) and of aggressiveness (e.g. over-marking) respectively, or total number of trials with an actual response when the distinction is not specified.

c Test of the “dear enemy phenomenon” (stranger *vs* neighbour). **YES** = higher interest towards the stranger’s scent, **NO** = no significant difference in the interest towards the stranger’s and neighbour’s scents (no differences), or higher interest towards the neighbour’s scent (“nasty neighbour phenomenon”). The measured signs of interest most generally involve scent sniffing.

d Test of the “dear enemy phenomenon” (stranger *vs* neighbour). **YES** = higher aggressivity towards the stranger’s scent, **NO** = no significant difference in the aggressivity towards the stranger’s and neighbour’s scents (no differences), or higher aggressivity towards the neighbour’s scent (“nasty neighbour phenomenon”). The measured signs of aggressivity most generally involve scent over-marking, but could also involve scraping, vocalization, etc. in some cases.

e Test of additional discrimination of the scents. **YES** = differences in interest and/or aggressivity response towards the scents, **NO** = no significant difference in interest and/ or aggressivity towards the scent

Whatever the mechanism, successful discrimination requires the existence of reliable indicators of the threat that an individual represents. In mammals, scent-marking provides information about territory occupancy and serves as a preventative measure for territory defence (Ralls, 1971; Gosling, 1982). In addition, it can provide information on the sender's identity (Scordato, Dubay, & Drea, 2007; Linklater, Mayer, & Swaisgood, 2013; Harris *et al.*, 2014), social status (Burgener *et al.*, 2009; Tinnesand *et al.*, 2013; Zidat *et al.*, 2018), sex (Setchell *et al.*, 2010; Rosell *et al.*, 2011; Vaglio *et al.*, 2016; Spence-Aizenberg *et al.*, 2018) or body condition (Buesching, Waterhouse, & MacDonald, 2002). Scent deposition may therefore play an important role in the behavioural response to territorial intrusion by if (and only if) it allows for a neighbour/stranger and/or social status discrimination. However, very few of the previous studies on the adjustment of behaviours according to intruders' geographic origin (i.e. the dear enemy phenomenon) and characteristics (i.e. social status) in mammals tested whether the scent-marks used displayed enough variation in their chemical composition to allow identification and discrimination between individuals (**Table 4**).

Here, we studied the behavioural responses of Alpine marmots (*Marmota marmota*) to territorial intrusions by different intruders (neighbours *vs* strangers and subordinates *vs* dominants) in a wild population. The Alpine marmot is a perfectly suited species to investigate this question. *i*) It is a highly social, cooperatively breeding and territorial species. Alpine marmots live in family groups of two to 20 individuals composed of a dominant couple monopolizing reproduction, subordinates of both sexes (related to at least one of the two dominants), and pups (Allainé, 2000; Allainé *et al.*, 2000). Social interactions within families are frequent and typically cohesive whereas face-to-face interactions between marmots from different family groups are rare and agonistic (Perrin, Allainé, & Le Berre, 1993). Territories, found adjacent to one another, are organized around a main burrow and are consistently used over years. The establishment of the dominant status for several years as well as the existence of adjacent and stable boundaries delimited by scent-marks deposited by dominant individuals of both sexes between territories lead to stable relationships between territory owners and create the necessary preconditions for a recognition of neighbours (Temeles, 1994). *ii*) Territories are mainly

defended by dominant individuals (Allainé, 2000) and scent-marking by orbital glands is the main passive mode of territory defence (Bel, Porteret, & Coulon, 1995; Bel *et al.*, 1999). Dominant individuals mark their territory boundaries and around their main burrows, and they over-mark and counter-mark foreign scent-marks (Bel *et al.*, 1995; Lenti Boero, 1995). Orbital gland scent-marks are thus highly relevant signals potentially involved in the dear-enemy phenomenon in this species. *iii*) Sexually mature subordinates (2 years and older) try to reach dominance (i.e. a territory and access to reproduction) by dispersing and displacing a dominant, which is then at high risk of mortality (Stephens *et al.*, 2002; Lardy *et al.*, 2011). Evicted dominants are generally dramatically injured and their probability to survive is extremely low (Walter, 1990; Lardy *et al.*, 2011). Therefore, a territory owner is expected to react more aggressively to same-sex sexually mature subordinates than to other dominants.

We proceeded in three steps. First, we tested for the existence of the dear-enemy phenomenon by conducting a two-way choice experiment between orbital gland scents of neighbour and stranger dominant males presented to dominant males and females. According to the dear-enemy hypothesis, we expected dominant marmots to spend different time smelling (a proxy of interest) and/or marking (a proxy of aggressiveness) scents from strangers than neighbours. Second, we tested for the existence of a social status-specific behavioural response by conducting a two-way choice experiment between orbital gland scents of dominant and sexually mature subordinate male strangers presented to dominant males and females. Following the hypothesis that subordinates represent a higher threat than dominants, we expected dominant individuals to spend more time smelling and/or marking scent-marks from subordinates than from dominants. Finally, we searched for a signature of social status in the chemical composition of orbital gland secretions in male Alpine marmots, using a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis.

MATERIAL AND METHODS

Field methods

This study was conducted from 2012 to 2017 taking advantage of a long-term individual-based monitoring of a wild population of Alpine marmots initiated in 1990 in the Nature Reserve of La Grande Sassi re (at 2,340 m a.s.l., French Alps, 45 29'N, 65 90'E, see Cohas *et al.*, 2006 for details on protocol). Marmots from up to 30 territories consistently used over years were monitored. The territories spread at roughly the same altitude along a typical Alpine valley, in an area of approximately 1.5 km long and 0.5 km wide. These contiguous territories spanned between 0.9 ha and 2.8 ha (Perrin *et al.*, 1993b). Marmots were followed from mid-April to mid-July each year, using both capture–mark–recapture and intensive behavioural observations. All individuals were individually marked with a metal numbered ear-tag (right side for females and left side for males). Dominants were additionally identified with a coloured plastic ear-tag on the opposite ear. Moreover, thanks to daily observations, the exact composition (sex, age and social status of individuals) of each family was known.

Once captured, marmots were tranquilized with Zol til 100 (0.1 mL.kg⁻¹) and the orbital gland area was shaved and cleaned with a sterile cotton swab saturated with ethanol 99% to remove any environmental contaminants. After full evaporation of ethanol, the orbital gland was pressed and its secretion was collected for both behavioural bioassays and chemical analyses.

Behavioural experiment

Experimental set-up

We used a two-way choice experimental design consisting of two vertical wooden sticks covered by glass tubes placed approximately 50 cm away from the main burrow entrance (to maximize the chances to be encountered by marmots) and 50 cm apart (to enable individuals to differentiate between scents of each tube: **Fig.27**). Two clean tubes were placed on each territory at the beginning of the field season to avoid reactions to the

introduction of a foreign object in the territory during the experiment. We replaced these tubes by experimental tubes, *i.e.* tubes with scent-marks, at the beginning of each trial.

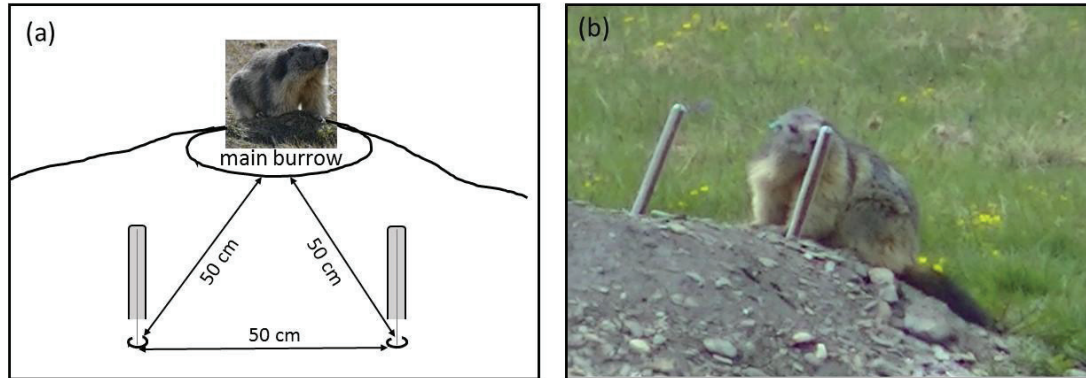


Figure 27 : The two-way choice experimental set-up (a) and a dominant male with a light green plastic tag on the right ear (indicating its social status and sex) involved in a trial (b).

Orbital gland scent collection

We dragged the distal half of a clean glass tube (200 mm long x 25 mm outside Ø, vwr® reference number 212-1126) along the orbital gland of captured and anesthetized individuals in order to mimic the natural marking behaviour on a foreign object. Depending on the amount of secretion, we collected one to six glass tubes per individuals. We wrapped each tube in aluminium foil and stored them in the dark at ambient temperature (approximately 5°C) until the beginning of the trials. Samples were used no more than three days after collection to avoid scent degradation and were always manipulated with aluminum foil to avoid contamination. Experimental tubes were collected from 40 dominant males (13, 22, 12, 14 and 17 in 2012, 2013, 2014, 2015 and 2017) and from 6 sexually mature subordinate males in 2017 (5 two-years old individuals and one older two-years, all of them being the sons of a dominant male for which a tube was collected in 2017).

General procedure

All trials were carried out between May 18th and June 27th from 2012 to 2017 and between 8:00 a.m. and 6:00 p.m, i.e. before the emergence of the pups and during the main activity period of the marmots. For each trial, we randomly assigned the experimental modalities and the two tubes to the wooden sticks to avoid bias due to individual preference for one side or the other. Focal individuals were never presented more than once with a given scent to avoid pseudo-replication. Then, the experimenter entered in the territory, placed the experimental tubes and left the territory. Although we typically observed marmots retreating into their burrows during the installation, they re-emerged within minutes. Once the tubes installed, between one and three observers continuously monitored the experimental set-up with 10x42 binoculars and/or 20x60 telescopes in order to identify individuals interacting with the tubes. Once a dominant was in close proximity to the experimental set-up, one observer recorded the focal individual with a digital video camera (Sony® Handycam model DCR-DVD650 or JVC® digital video model GZ-E 209) until it moved away from the set-up. A given trial was considered a success when a dominant interacted (i.e. smelled and/or marked) with at least one tube and was considered a failure when no dominant approached the experimental set-up within four hours after the installation (Cross, Blumstein, & Rosell, 2013) or if a subordinate interacted with either or both of the tubes before a dominant individual. In case of failure, the trial was aborted and repeated later with new scent samples.

Dear enemy test

This test was conducted from 2012 to 2015. We implemented three experimental settings: “stranger *vs* neighbour” (N = 41), “stranger *vs* control” (N = 53) and “neighbour *vs* control” (N = 33). The first setting tested for a higher aggressiveness of dominant individuals toward “strangers” (i.e. tubes scent-marked by a dominant male residing within a territory that has no common boundary with the focal individual) than towards “neighbours” (i.e. tubes scent-marked by a dominant male residing within a territory that has a common boundary with the focal individual). Dominants’ scent-marks were preferred over subordinates’ ones because neighbour dominants should be considered as non-

threatening since the focal individuals should know that they defend a territory through regularly encountering scent-marks of their dominant neighbour at the border of their territory while neighbour and stranger subordinates could easily be perceived as equally threatening given that all can be in search of a territory. To avoid a potential effect of the status, we were left with the only possibility to compare behaviours towards neighbour and stranger dominants to test the dear enemy hypothesis. The two other experiments (i.e. comparison of scent-marked tubes against “control” tubes without marmot scent) allowed us to control that responses towards scent-marked tubes were not due to the presence of a new object in the territory and to indirectly test for the dear enemy hypothesis.

Social status-specific test

This test was conducted in 2017 to discard the possibility that the outcome of the dear enemy test could have resulted from the presented scent-marks being from dominants rather than subordinates. An experimental setting called “dominant *vs* subordinate” ($N = 16$) was performed to test whether unknown subordinate individuals that do not yet have a territory, and thus should be perceived as highly threatening, elicit a stronger response than unknown dominant individuals that do already have one. For each trial, we used two tubes: one scent-marked by a dominant male (we collected orbital gland scent of 6 dominants) and the other by a sexually mature subordinate of the same family (the subordinate being the son of the dominant male used for the trial, we collected orbital gland scent of 6 subordinates), both being stranger for the focal individual. We chose to use a subordinate and a dominant of the same family to limit differences between the two individuals other than their social status.

Measures of response

Video recordings were displayed in Microsoft Windows Media Player (Microsoft®) in slow motion ($\times 0.5$) to ensure an accurate identification of behaviours as well as to score their duration with an accuracy of 0.5 s. Both the time the focal dominant marmot spent smelling and marking each tube were recorded as well as the number of marks. Smelling

and marking behaviours are indeed widely recognized respectively as measures of interest and aggressiveness towards odour stimulus in rodents such as, for instance, in the closely related yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*; Johns & Armitage, 1979; Brady & Armitage, 1999; Cross *et al.*, 2013). In Alpine marmots, while smelling is not typically associated with aggressivity, over-marking is associated with tail flapping, a recognized aggressive behaviour in this species.

Statistical analyses

Since receivers' characteristics (e.g. sex) matter (Christensen & Radford, 2018), dominant males and females were analysed separately. We favoured paired tests to increase the statistical power and to reduce the effects of confounders. We further used non-parametric statistics due to data not fitting assumptions for parametric analysis, precluding even the use of generalized linear models. First, to determine whether Alpine marmots were more interested and/or aggressive towards orbital gland scents than towards new objects, "stranger *vs* control" and "neighbour *vs* control" trials were considered. Two series of three two-tailed Wilcoxon paired tests were used. Specifically, we tested if the behavioural response (smelling time, marking time and number of marks) was different for "stranger" and for "neighbour" tubes than for "control" tubes. Then, to determine whether Alpine marmots were differently interested and/or aggressive towards stranger scents than neighbour scents, "stranger *vs* neighbour" trials were considered. Again, three two-tailed Wilcoxon paired tests were used and we tested whether the behavioural response (smelling time, marking time and number of marks) was different for "stranger" than for "neighbour" scents. Finally, to determine whether aggressivity towards subordinate scents than dominant scents was different, "subordinate *vs* dominant" trials were considered. Again, three two-tailed Wilcoxon paired tests were used and we tested whether the behavioural response differed for "subordinate" than for "dominant" scents. In our study, all dominants smelled at least one glass tube per trial but only some of the dominants marked at least one tube. Thus, sample sizes vary in the statistical analysis. The sample size necessary to evidence relatively small, medium, and large effects (corresponding to D-value of 0.20, 0.60, and 0.80; Cohen *et al.*, 1988) are 225, 26, and 15 tests, respectively (Shieh *et al.*, 2007).

Chemical characterization of orbital gland secretion

Orbital gland scent collection

We collected orbital gland secretions from 43 male Alpine marmots of two years and older (up to 11 years old; 18 dominants and 25 subordinates), living in 24 different territories between 12th May and 9th July 2016. In addition, we sampled again the six of the 25 subordinate individuals in 2017 after they reached dominance. We collected orbital gland secretions with a 5 μ L glass capillary wearing clean nitrile gloves to avoid contamination. Once collected, the secretion was then placed into a 1.5 mL opaque chromatographic glass vial filled in advance with 200 μ L of dichloromethane solvent (HiPerSolv CHROMANORM for HPLC; VWR, Center Valley, PA, USA). In each 200 μ L we added an internal standard, biphenyl (molecular weight, 154.21 g.mol⁻¹, 99.5%; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at a concentration of 0.2 g.L⁻¹. Several “field control samples” (*i.e.* vials without marmot secretions and only with solvent) were collected using the same protocol, to control for possible contamination related to the collection protocol. Finally, all samples were sealed with a Teflon-lined cap and stored at -20°C in the field and at -80°C in the laboratory until GC-MS analysis.

GC-MS analysis

We transferred all scent samples in 0.3 mL inserts in new, clean vials to enable their injection in an interfaced Hewlett-Packard 6890 GC system equipped with a non-polar DB-5 MS column (30 m long x 0.25 mm ID x 0.25 μ m film thickness, Agilent technologies) coupled with an HP 5973 MSD (Mass Selective Detector) mass spectrometer (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA). Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ and an electron impact ionisation of 70 eV was applied. After having vortexed all vials to homogenize scent samples, 2 μ L of sample was injected automatically in splitless mode. The temperature of injection was set to 300 °C and the oven temperature program started with 4 min at 90 °C, then increased by 12 °C.min⁻¹ up to 210 °C, and then increased again at 5 °C.min⁻¹ up to 310 °C and finally was held at 310 °C for 5 min. We also ran blank samples containing dichloromethane only every 7 samples. These controls allow an

estimation of the potential noise related to the potential accumulation of some compounds along the column or of the instrument drift over time, for example.

Chromatographic data processing

Scent secretions of individuals were characterized by several peaks (i.e. a scent profile) and each of them represents one compound (defined by a specific retention time and mass spectrum). For each sample, we acquired area of each peak (i.e. integration of the area under the curve) by both an automatic integration with Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (B.07.01 version) and manual check. Furthermore, the internal standard (biphenyl) was used to control instrument drift over time. Three compounds were found in field control samples that were considered as contaminants and therefore, removed from analysis. We further removed all compounds present in less than 5% of the individuals of the two groups because their rarity made unlikely any contribution to the discrimination of the social status in subsequent analysis. Then, we converted each single peak area into a percentage of the sum of all compounds' area to obtain the relative abundance of each compound. Finally, we removed peaks with a relative low abundance ($< 0.05\%$) to exclude background noise (Drea *et al.*, 2013), and took the square-root of the final data set to reduce the impact of the most abundant compounds upon our analyses (Clarke & Warwick, 2001).

Statistical analyses

We first tested whether orbital gland secretion informs on social status and differs between dominant and sexually mature subordinate male marmots, using scent samples of 2016. For that, we calculated Euclidean distances between every pair of samples to obtain a resemblance matrix, from which we conducted a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; (Anderson, 2001; 2017) using 9999 permutations, to test whether chemical composition differed according to social status. Then, we carried out a principal components analysis (PCA) on the correlation matrix to reduce the number of compounds and to highlight only those that explain most of the variance (Drea *et al.*, 2013). We retained compounds with a cumulative contribution on the first three axes

> 60% of the total contribution. We conducted a second PERMANOVA on this chemical data subset to check that this compound selection did not change results obtained with the first PERMANOVA. Then, we performed a Linear Discriminant Analysis (LDA) on all orbital gland scent samples (N=43 in 2016 and N=6 in 2017) to investigate whether variation in the chemical composition of orbital gland scents can be used to separate individuals according to their social status and, for the six dominant individuals in 2017 which were subordinates in 2016, to visualize the variation in chemical composition according to their change of social status.

All statistical analyses were conducted in R v. 3.4.3 (R Core Team 2017) with “ade4” (Dray & Dufour, 2007) and ‘adegraphics’ packages (Siberchicot *et al.*, 2017) for PCA, “vegan” package (adonis function, Oksanen *et al.*, 2018) for PERMANOVAs, and “MASS” package (lda function, Venables & Ripley, 2002) for the LDA.

Ethical Note

All work adheres to the ASAB/ABS Guidelines for the Use of Animals in Research. The laboratory “Biométrie et Biologie Evolutive” is authorized to use animals in research (arrêté préfectoral n° DDPP69-2013-008), the protocol was approved by the University of Lyon 1 Ethical Committee (CEEA-55, protocol BH2012-92-V1) and the authorization to capture Alpine marmots was issued by the Préfecture de Savoie (arrêté préfectoral n° 2013/02) after approval by the advisory committee of the Nature Reserve of La Grande Sassièrre. All the handling and sampling were done by four co-authors who are authorized for experimentation with animals by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (diploma numbers R45GRETAf110, R69UCBL-ENVL-F1-03, R-13CNRS-F1-10 and 0ETRY20090520).

Once captured, marmots were rapidly transferred in a dark burlap bag to limit stress and were transported to a nearby cabin to be handled in a calm and cool room. Once tranquilized, handling lasted a maximum of 10 min. The recovery did not require the use of an antidote. To recover, marmots were placed again in a calm and cool room for 15 min until they were able to walk. All tranquilized marmots recovered well and no adverse

effects have been noticed: all individuals were observed alive the day after their capture. Tranquilizing pregnant or lactating females did not have any obvious impact on offspring as all the females successfully raised offspring to weaning. Overall, individuals were absent from their territory for a maximum of 40 min. We never observed exclusion from the territory for any individual of any age following capture.

Although behavioural bioassays required continuous observation of the focal individual, care was taken to avoid disturbance. To do so, animals were observed from a distance with 10 x 42 binoculars and/or 20 x 60 telescopes and filmed with cameras with powerful optical zoom. This allowed observers to sit on the path that crosses the study site and to avoid entering the focal marmot territory or the neighbouring territories.

RESULTS

Behavioural experiment

Over the 143 trials conducted, 127 concerned the dear enemy test (53 “stranger *vs* control” experiments, 33 “neighbour *vs* control” experiments, 41 “stranger *vs* neighbour” experiments) and 16 “subordinate *vs* dominant” tests. Eighty-six dominant males (trials per male: mean $\pm$ SD = 2.53 $\pm$ 1.89) and 57 dominant females (trials per female: mean $\pm$ SD = 1.78 $\pm$ 1.21) were tested in these trials.

Dear enemy test

Males spent significantly different time smelling stranger (mean difference = 10.81, $V = 552$, $p\text{-value} < 0.001$, $N = 35$, **Fig.28a**) and neighbour (mean difference = 8.10, $V = 148$, $p\text{-value} = 0.01$, $N = 18$; **Fig.28a**) scents than control. Females also spent significantly different time smelling stranger scents than control (mean difference = 6.49, $V = 140.5$, $p\text{-value} = 0.02$, $N = 18$; **Fig.28a**). However, females did not spend different time smelling neighbour scents than control (mean difference = 1.81, $V = 87.5$, $p\text{-value} = 0.13$, $N = 15$; **Fig.28a**). Neither males nor females spent different time smelling stranger scents than neighbour scents (males: mean difference = -2.20, $V = 123$, $p\text{-value} = 0.66$, $N = 23$; females: mean difference = -0.14, $V = 63$, $p\text{-value} = 0.35$, $N = 18$; **Fig.28a**).

Contrary to our expectations, males did not spend different time marking (“stranger *vs* control”: mean difference = -2.31, $V = 141$, $p\text{-value} = 0.64$, $N = 22$; “neighbour *vs* control”: mean difference = 0.17, $V = 55$, $p\text{-value} = 0.53$, $N = 13$; **Fig.28b**) or did more marks (“stranger *vs* control”: mean difference = 0.36, $V = 115.5$, $p\text{-value} = 0.71$, $N = 22$, “neighbour *vs* control”: mean difference = 0.17, $V = 55$, $p\text{-value} = 0.53$, $N = 13$, **Fig.28c**) on stranger and neighbour scents than control. On the contrary, females spent significantly different time marking (mean difference = 2.16, $V = 75.5$, $p\text{-value} = 0.04$, $N = 13$; **Fig.28b**) and did a different number of marks (mean difference = 1.77, $V = 80$, $p\text{-value} = 0.02$, $N = 13$, **Fig.28c**) on stranger scents than control. However, females did not spend different time marking (mean difference = 1.11, $V = 37$, $p\text{-value} = 0.36$, $N = 10$; **Fig.28b**) or marked differently (mean

difference = 1.00, $V = 17$, p-value = 0.20, $N = 10$, **Fig.28c**) neighbour scents than control. Neither males nor females spent different time marking (males: mean difference = -0.26, $V = 39.5$, p-value = 0.43, $N = 15$; females: mean difference = 0.48, $V = 55$, p-value = 0.54, $N = 13$, **Fig.28b**) or did different number of marks (males: mean difference = -0.13, $V = 33$, p-value = 0.39, $N = 15$; females: mean difference = 0.23, $V = 43$, p-value 0.78, $N = 8$, **Fig.28c**) stranger than neighbour scents .

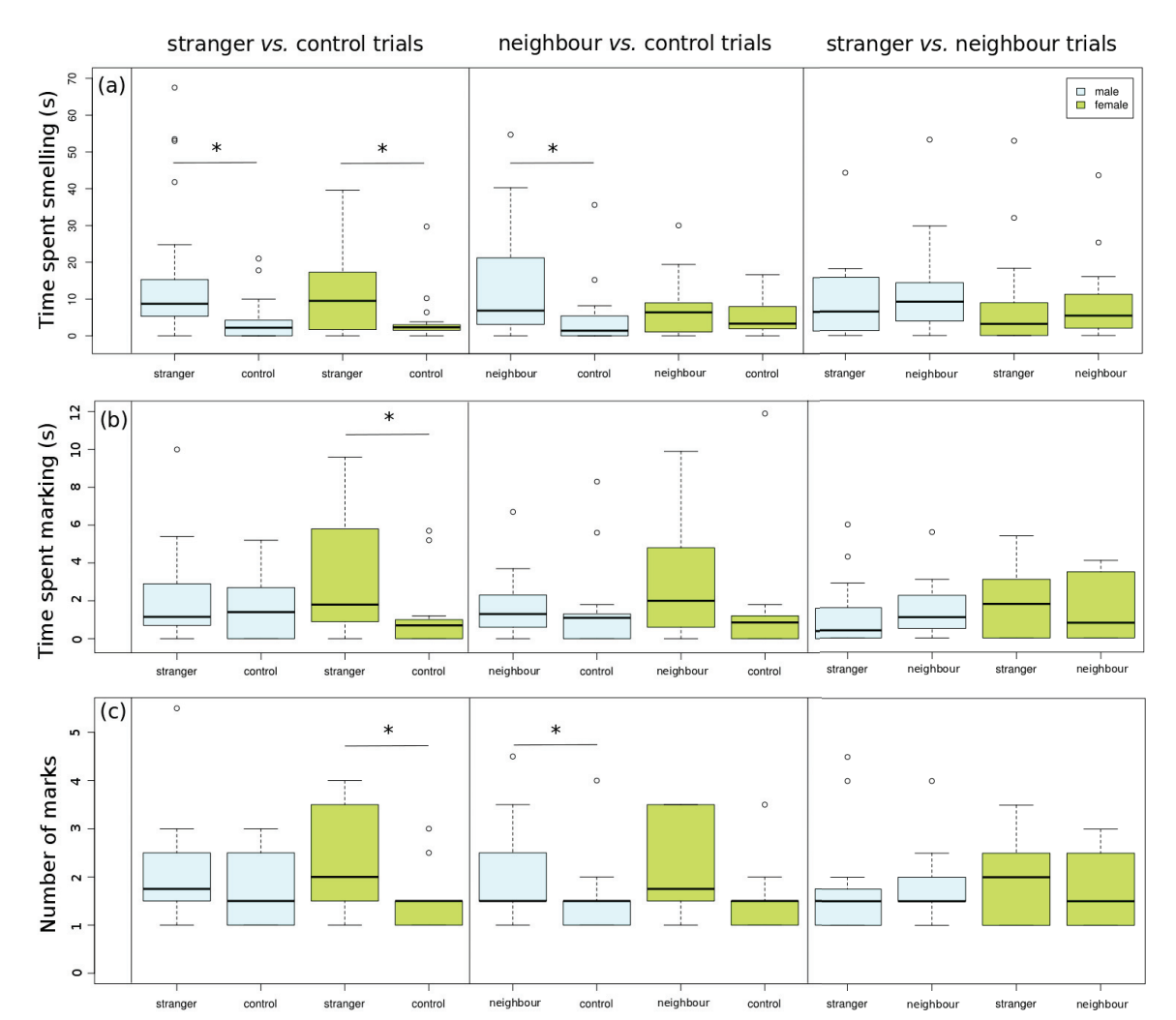


Figure 28 : Time spent smelling (a), time spent marking (b) and number of marks (c) by male and female dominant Alpine marmots for the three dear enemy experimental modalities (“stranger vs control”, “neighbour vs control” and “stranger vs neighbour”). The line in the boxplot indicates the median and the lower and upper ends indicate the first and fourth quartiles, respectively. *: P-value < 0.05 for two-tailed Wilcoxon paired tests.

Subordinate vs dominant test

Neither males nor females spend different time smelling (males: mean difference = -4.11, $V = 11$, p -value = 0.11, $N = 10$; females: mean difference = 5.18, $V = 16$, p -value = 0.31, $N = 6$, **Fig.29a**), marking (males: mean difference = -3.90, $V = 4$, p -value = 0.97, $N = 7$; females: mean difference = -0.75, $V = 4$, p -value 0.88, $N = 4$, **Fig.29b**) or did different number of marks on subordinate scents than on dominant scents (males: mean difference = -2.14, $V = 4$, p -value = 0.11, $N = 7$; females: mean difference = -0.75, $V = 4$, p -value = 0.88, $N = 4$, **Fig.29c**).

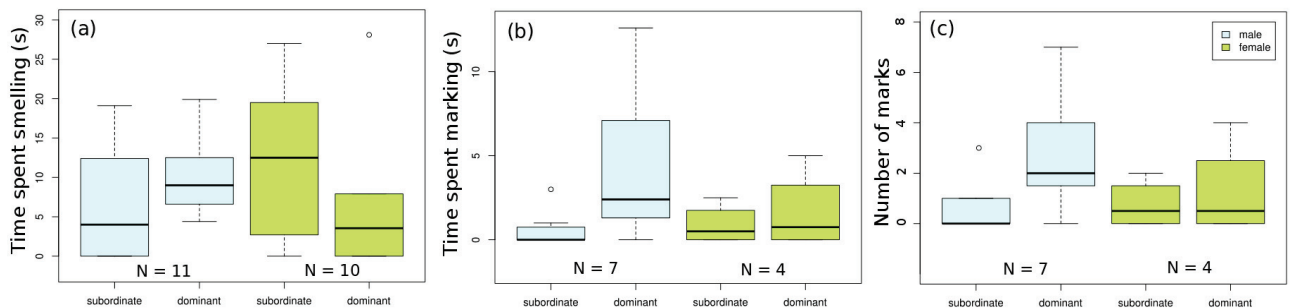


Figure 29 : Time spent smelling (a), time spent marking (b) and number of marks (c) in male and female dominant Alpine marmots for the “subordinate vs dominant” experimental modality. The line in the boxplot indicates the median and the lower and upper ends indicate the first and fourth quartiles, respectively. *: P -value < 0.05 for two-tailed Wilcoxon paired tests.

Social status impacts on scent profiles

A total of 28 chemical compounds were detected in 43 individual’s orbital secretions (mean $\pm$ SD = 12.54 ± 3.26 compounds per individual). Orbital gland secretions from dominant ($N=18$) and subordinate ($N=25$) males contained the same number of chemical compounds (dominants: mean $\pm$ SD = 13.17 ± 3.76 , subordinates: mean $\pm$ SD = 12.08 ± 2.84 , $t_{1,41} = 1.08$, p -value = 0.29). However, secretions from dominants and subordinates strongly differed in their composition (PERMANOVA: pseudo- F $F_{1,41} = 2.51$, p -value = 0.004). The PERMANOVA performed on the 11 compounds with a global contribution to the first three axes of the PCA > 60% gave similar results than the one

performed on all compounds (pseudo- $F_{1,41} = 2.52$, p -value = 0.03). Dominants were easily discriminated from sexually mature subordinates on the basis of these 11 compounds: 75% (18 over 25; $N=18$ in 2016 and $N=6$ in 2017) of dominant individuals and 80% (20 over 25) of sexually mature subordinates were correctly assigned (**Fig.30**). In addition, the orbital gland secretions of the six individuals that became dominant in 2017 changed in agreement with their social status (**Fig.30**). Even if two misclassified individuals had one of their secretion assigned to the wrong social status they still presented a drastic change in the characteristics of their secretion associated with their change of social status (**Fig.30**).

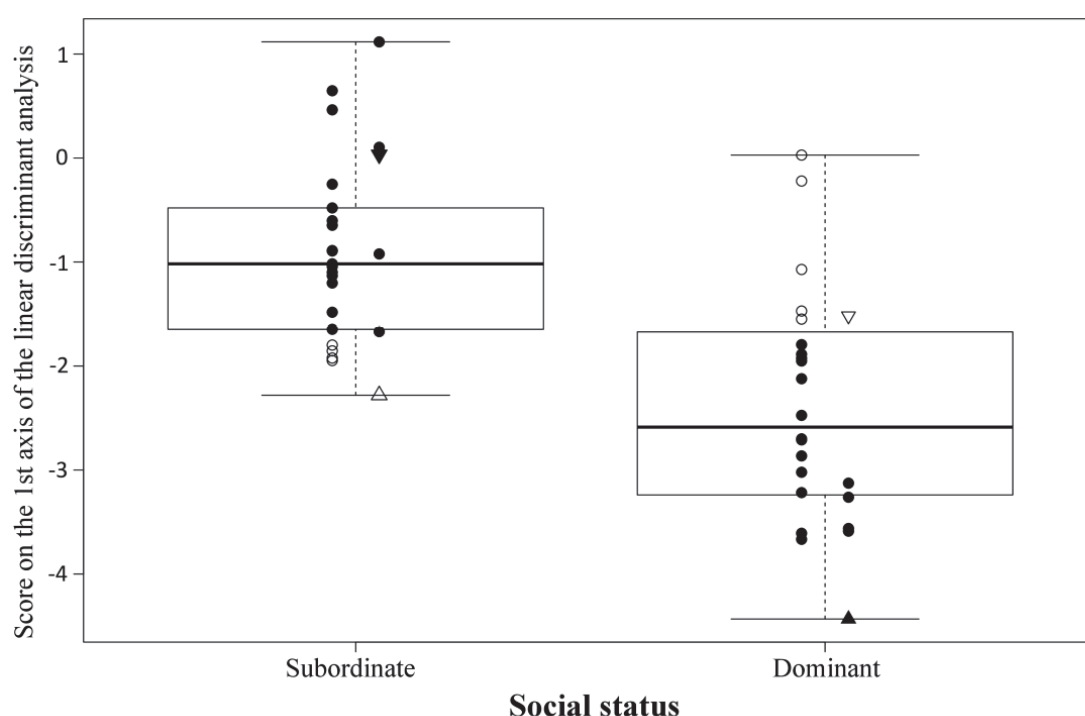


Figure 30 : Score on the 1st axis of the linear discriminant analysis based on the 11 chemical compounds contributing the most to secretions discrimination (see Material and Methods for details on identification of these compounds) for dominant and subordinate individuals. The line in the boxplot indicates the median and the lower and upper ends indicate the first and fourth quartiles, respectively. Black symbols indicate observed values classified according to their social status, open symbols indicate observed values misclassified. Symbols on the right parts of the boxplots represent observed values for the six individuals sampled as subordinates in 2016 and as dominants in 2017. Downward triangle represents the individual misclassified as a dominant when it was subordinate and upward triangle represents the individual misclassified as a subordinate when it was a dominant.

DISCUSSION

Contrary to our predictions, we did not find any evidence of the dear enemy phenomenon in dominant Alpine marmots. Dominant individuals indeed were not more aggressive towards stranger than neighbour dominant scents. Furthermore, dominants did not show more aggressivity towards orbital gland secretions of subordinate than dominant males, although the social status was encoded in these secretions. Given the power analysis and the sample sizes of previous studies evidencing effects (**Table 4**), we are confident that the results are robust. Overall, our results suggest that dominant individuals are equally threatened by any individual from outside their family group.

No dear enemy phenomenon in the Alpine marmot: neighbours, strangers, same fight

Dominants of both sexes were not more aggressive towards orbital gland scents from stranger than neighbour dominants emphasizing an absence of dear enemy phenomenon in our population. This result was observed even though the chosen stimulus was involved in territory defence and defensive behaviours. Indeed, Alpine marmots defend their territory by scent-marking their territorial boundaries with their orbital glands and by over-marking and counter-marking foreign orbital scent-marks (Bel *et al.*, 1995; Lenti Boero, 1995). This absence of dear enemy phenomenon in Alpine marmots contrasts with both theoretical predictions (Temeles, 1994) and empirical findings in other mammals (**Table 4**). For example, in beavers (*Castor canadensis* and *C. fiber*), anal gland scents of stranger males elicit stronger responses (i.e. smelling and marking) from both sexes than anal gland scents of neighbour males (Schulte, 1998; Rosell & Bjørkøyli, 2002, **Table 4**). However, recent literature supports the idea that defensive behaviour towards neighbours and strangers is not as dichotomous as it was previously thought, especially in social species (Christensen & Radford, 2018; Kranstauber & Manser, 2018; McGregor & Bee, 2018; Radford & Christensen, 2018; Ridley & Mirville, 2018; Thompson & Cant, 2018, see **Table 4** for examples in mammals). Indeed, different neighbour-stranger behavioural responses could be displayed such as the dear enemy phenomenon (the most

studied hypothesis), the nasty neighbour effect, but also no different neighbour-stranger responses (Müller & Manser, 2007; Christensen & Radford, 2018). In the yellow-bellied marmot (*Marmota flaviventris*), a social species closely-related to the Alpine marmot, no difference was found between the time female dominants spent marking anal gland scents from stranger and neighbour females, indicating the absence of the dear enemy phenomenon also in this species (Cross *et al.*, 2013, **Table 4**).

Social status as a confounding factor?

The absence of dear enemy phenomenon in our population could be explained by the fact that in Alpine marmots, dominants never change territory and thus represent no threat. But, we did not observe any difference of behaviours in response to male dominants' and subordinates' scents. Although the analysis comparing behaviours towards the scents of subordinate and dominant has a limited statistical power, the direction of the effect is contrary to that expected with individuals reacting more strongly to the smells of dominant than those of subordinates. Former studies on other species did evidence difference in behaviour towards individuals with different social status with comparable sample size (Table 1). In group-living species, the level of threat posed by an intruder is likely to depend on other characteristics of the intruders and the social status of an intruder should highly drive owners interests and motivations (Rosell, Gundersen, & Le Galliard, 2008). For instance, in Eurasian beavers (*Castor fiber*), Tinnesand *et al.* (2013) found that dominant residents were more aggressive towards anal gland scents from subordinate than dominant strangers. In Alpine marmots, dispersing subordinates play an all-or-nothing tactic. Indeed, sexually mature subordinates (two years and older) in dispersal reach dominance or die during the active season, but never become subordinates in a new family group (Grimm *et al.*, 2003). Subordinate and dominant strangers thus clearly represent different levels of threat to a dominant's tenure in marmots although no difference in behavioural responses was evidenced.

Discrimination of intruders

Previous studies in social species (including Alpine marmots) confirm that discrimination of neighbours *vs* strangers is likely to occur in our population. In social species, discrimination between own-group members (no threat) and other individuals (potential threat) through scent has been largely reported (Radford, 2005; Christensen *et al.*, 2016). If individuals learn how to identify own-group members thanks to their scent, there is no reason to think that they cannot discriminate neighbours from strangers. Individuals may indeed remember neighbours identities and then discriminate unknown (stranger) individuals by contrast (Gheusi *et al.*, 1997; Johnston & Bullock, 2001). Such discrimination has even been hypothesized to be enhanced in species with stable territories and repeated encounters with neighbours (Stoddard *et al.*, 1990; Rosell & Bjørkøyli, 2002) such as in Alpine marmots.

Chemical composition of orbital gland secretions of both dominant and subordinate males differed, suggesting the orbital gland secretions can potentially inform Alpine marmots about the males' social status. Therefore, the absence of behavioural differences in response to dominant and subordinate orbital gland scents is unlikely to be caused by a lack of chemical composition difference between subordinates and dominants. Such chemical signature of social status is common in mammals' odorant secretions (e.g. Burgener *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010; Tinnesand *et al.*, 2013). Although in our data the social status may be confounded with the age (because the majority of subordinate individuals were two-years old, whereas all dominant individuals were 3 years or older), Zidat *et al.* (2018) found, in a study of anal gland secretions of Alpine marmots, that for a given age (three-years old) differences in chemical composition according to the social status persist. Furthermore, whether the observed variation in chemical composition is due to the social status or an age effect, the same behavioural response is to be expected since two-years old individuals are the more likely to be in search of a territory.

The whole social-group is threatened by any intrusion

The absence of behavioural adjustment by both male and female dominants to the geographic provenance or the social status of the intruders, despite a social status signature present in orbital gland secretions, suggests that intruders may all represent similar perceived threats in Alpine marmots. In this species, no matter which intruder enters a given territory, no foreigners are welcome. This is in agreement with interactions between a dominant marmot and marmots from different family groups being rare and agonistic, and this whatever the social status of the intruders (Perrin *et al.*, 1993b). In group-living species, the relative threat of an intruder (any individual from outside the social group, regardless of being neighbour, stranger, dominant or subordinate) should be understood not only as a threat to the dominant pair, but also as a risk for all the members of its group (e.g. group dynamics, reproductive success, fitness). Therefore, any intruder, whatever its identity, might represent an important threat in Alpine marmots, and not only to dominants' tenure. The consequence of an intrusion by a male, as simulated in our behavioural experiments, is obviously the eviction and the death of the dominant resident male (Lardy *et al.*, 2011). But, a take-over by a male can also involve the infanticide of the pups and of yearling males (Lardy *et al.*, 2011; 2015) and force dispersal of male subordinates (Dupont, 2017). Moreover, although rare, dominants have been observed killing their neighbours' pups. Such threats could explain why despite their tenure not being at stake, dominant female Alpine marmots show similar response to any dominant or subordinate male intruder scent in our experiments.

These threats could have been further strengthened by the location of the presented scent. Indeed, we placed the trial at the center of the territory and not at the border in order to maximize the chances to get a successful trial (i.e. individuals spend more time around the main burrow situated at the center of the territory). The placement of the stimulus outside, at the border or in the center of the territory may modify the territory owners' behaviours (McGregor & Bee, 2018; Radford & Christensen, 2018). Although dominant Alpine marmots mark their main burrows in addition to the territory boundaries (Bel *et al.*, 1995; Lenti Boero, 1995), the central position of the experiment may have strengthen the level of the perceived threat. Indeed, if an intruder reaches the center

of the territory not only a risk of territory lost is present but there is a high risk of serious attack (e.g. infanticide). The location of the experimental set-up at the center of territories may thus have caused or reinforced the idea that no foreigners are welcome.

Conclusion

Territorial behaviours in group living species are far from being stereotyped. Despite higher aggressive responses towards strangers and subordinates than towards neighbours and dominants respectively have been repeatedly predicted, species responses show a high variation (**Table 4**). Our results suggest that, in Alpine marmots, no outsider is welcome regardless of its geographical provenance (i.e. neighbour or stranger) or social status.

The present study follows the recent (Christensen & Radford, 2018)'s call for empirical research considering a more holistic approach of the evolution and maintenance of territoriality. Our study emphasizes the necessity to step away from the simplistic dichotomy between neighbours and strangers to move towards a more comprehensive, multifactorial, nature of territory defence through the consideration of various characteristics of territory owners (e.g. sex, body condition) and social groups (e.g. size, sex and age composition), the characteristics of an intruder (e.g. sex, social status, familiarity), the characteristics of the characteristics of the intrusion (e.g. location, timing) and of the impact of these different characteristics on the threat perceived.

REFERENCES

- Allainé D. 2000. Sociality, mating system and reproductive skew in marmots: evidence and hypotheses. *Behavioural Processes* **51**: 21–34.
- Allainé D, Brondex F, Graziani L, Coulon J, Till-Bottraud I. 2000. Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behavioral Ecology* **11**: 507–514.
- Anderson MJ. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**: 32–46.
- Anderson MJ. 2017. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). In: Balakrishnan N, Colton T, Everitt B, Piegorsch W, Ruggeri F, Teugels JL, eds. *Wiley statsref: statistics reference online*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 1–15.
- Aragon P, López P, Martín J. 2000. Size-dependent chemosensory responses to familiar and unfamiliar conspecific faecal pellets by the Iberian rock-lizard, *Lacerta monticola*. *Ethology* **106**: 1115–1128.
- Bel MC, Coulon J, Sreng L, Allainé D, Bagnères AG, Clément JL. 1999. Social signals involved in scent-marking behavior by cheek-rubbing in Alpine marmots (*Marmota marmota*). *Journal of Chemical Ecology* **25**: 2267–2293.
- Bel MC, Porteret C, Coulon J. 1995. Scent deposition by cheek rubbing in the alpine marmot (*Marmota marmota*) in the French Alps. *Canadian Journal of Zoology* **73**: 2065–2071.
- Blumstein DT, Im S, Nicodemus A, Zugmeyer C. 2004. Yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*) hibernate socially. *Journal of Mammalogy* **85**: 25–29.
- Booksmythe I, Jennions MD, Backwell PRY. 2010. Investigating the ‘dear enemy’ phenomenon in the territory defence of the fiddler crab, *Uca mjoebergi*. *Animal Behaviour* **79**: 419–423.
- Bradbury JW, Vehrencamp SL. 2011. *Principles of Animal Communication*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Brady KM, Armitage KB. 1999. Scent-marking in the yellow-bellied marmot (*Marmota flaviventris*). *Ethology Ecology & Evolution* **11**: 35–47.
- Buesching CD, Jordan. 2018. The function of small carnivore latrines: case studies and a research framework for hypothesis-testing. In San EDL, Sato JJ, Belant JL, Somers MJ, eds. *Small Carnivores: Evolution, Ecology, Behaviour and Conservation*. Wiley Publishing.
- Buesching CD, Waterhouse JS, MacDonald DW. 2002. Gas-Chromatographic analyses of the subcaudal gland secretion of the European badger (*Meles meles*) Part II: Time-related variation in the individual-specific composition. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 57–69.
- Burgener N, Dehnhard M, Hofer H, East ML. 2009. Does anal gland scent signal identity in the spotted hyaena? *Animal Behaviour* **77**: 707–715.

- Christensen C, Kern JM, Bennitt E, Radford AN. 2016. Rival group scent induces changes in dwarf mongoose immediate behavior and subsequent movement. *Behavioral Ecology* **27**: 1627–1634.
- Christensen C, Radford AN. 2018. Dear enemies or nasty neighbors? Causes and consequences of variation in the responses of group-living species to territorial intrusions. *Behavioral Ecology* **29**: 1004–1013.
- Clarke KR, Warwick RM. 2001. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. Plymouth: Primer- e Ltd.
- Cohas A, Yoccoz NG, Da Silva A, Goossens B, Allainé D. 2006. Extra-pair paternity in the monogamous alpine marmot (*Marmota marmota*): the roles of social setting and female mate choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59**: 597–605.
- Cross HB, Blumstein DT, Rosell F. 2013. Do marmots display a ‘dear enemy phenomenon’ in response to anal gland secretions? *Journal of Zoology* **289**: 189–195.
- Dray S, Dufour AB. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**: 1–20.
- Drea CM, Boulet M, Delbarco-Trillo J, Greene LK, Sacha CR, Goodwin TE, Dubay GR. 2013. The “secret” in secretions: methodological considerations in deciphering primate olfactory communication. *American Journal of Primatology* **75**: 621–642.
- Fisher J. 1954. Evolution and bird sociality. In Huxley J, Hardy AC, Ford EB, eds. *Evolution as a process*. London: Allen & Unwin. 71–83.
- Gheusi G, Goodall G, Dantzer R. 1997. Individually distinctive odours represent individual conspecifics in rats. *Animal Behaviour* **53**: 935–944.
- Gosling LM. 1982. A reassessment of the function of scent marking in territories. *Zeitschrift für Tierpsychologie* **60**: 89–118.
- Gosling LM, McKay HV. 1990. Competitor assessment by scent matching: an experimental test. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **26**: 415–420.
- Grimm V, Dorndorf N, Frey-Roos F, Wissel C, Wyszomirski T, Arnold W. 2003. Modelling the role of social behavior in the persistence of the alpine marmot *Marmota marmota*. *Oikos* **102**: 124–136.
- Harris RL, Holland BR, Cameron EZ, Davies NW, Nicol SC. 2014. Chemical signals in the echidna: differences between seasons, sexes, individuals and gland types. *Journal of Zoology* **293**: 171–180.
- Harris MA, Murie JO. 1982. Responses to oral gland scents from different males in Columbian ground squirrels. *Animal Behaviour* **30**: 140–148.
- Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG. 2001. Increased social dominance in male rabbits, *Oryctolagus Cuniculus*, is associated with increased secretion of 2-Phenoxy Ethanol from the chin gland. In: Marchlewska-Hoj A, Lepri JJ, Müller-Schwarzse D, eds. *Chemical Signals in Vertebrates* 9. Boston: Springer US, 335–341.

- Heinze J, Foitzik S, Hippert A, Hölldobler B. 1996. Apparent dear-enemy phenomenon and environment-based recognition cues in the ant *Leptothorax nylanderi*. *Ethology* **102**: 510–522.
- Hébert P, Barrette C. 1989. Experimental demonstration that scent marking can predict dominance in the woodchuck, *Marmota monax*. *Canadian Journal of Zoology* **67**: 575–578.
- Herr J, Müller-Schwarze D, Rosell F. 2006. Resident beavers (*Castor canadensis*) do not discriminate between castoreum scent marks from simulated adult and subadult male intruders. *Canadian Journal of Zoology* **84**: 615–622.
- Höjesjö J, Johnsson JL, Petersson E, Järvi T. 1998. The importance of being familiar: individual recognition and social behavior in sea trout (*Salmo trutta*). *Behavioral Ecology* **9**: 445–451.
- Isler K, van Schaik CP. 2012. Allomaternal care, life history and brain size evolution in mammals. *Journal of Human Evolution* **63**: 52–63.
- Jaeger RG. 1981. Dear enemy recognition and the costs of aggression between salamanders. *The American Naturalist* **117**: 962–974.
- Johns DW, Armitage KB. 1979. Behavioral ecology of alpine yellow-bellied marmots. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **5**: 133–157.
- Johnston RE, Bullock TA. 2001. Individual recognition by use of odours in golden hamsters: the nature of individual representations. *Animal Behaviour* **61**: 545–557.
- King WJ. 1989. Spacing of female kin in Columbian ground squirrels (*Spermophilus columbianus*). *Revue canadienne de zoologie* **67**: 91–95.
- Kranstauber B, Manser MB. 2018. Mating and/or social system to explain territorial responses: a comment on Christensen and Radford. *Behavioral Ecology* **29**: 1017–1018.
- Lardy S, Allainé D, Bonenfant C, Cohas A. 2015. Sex-specific determinants of fitness in a social mammal. *Ecology* **96**: 2947–2959.
- Lardy S, Cohas A, Figueroa I, Allainé D. 2011. Mate change in a socially monogamous mammal: evidences support the “forced divorce” hypothesis. *Behavioral Ecology* **22**: 120–125.
- Lenti Boero D. 1995. Scent-deposition behaviour in Alpine marmots (*Marmota marmota* L.): its role in territorial defence and social communication. *Ethology* **100**: 26–38.
- Linklater WL, Mayer K, Swaisgood RR. 2013. Chemical signals of age, sex and identity in black rhinoceros. *Animal Behaviour* **85**: 671–677.
- Lukas D, Clutton-Brock T. 2012. Cooperative breeding and monogamy in mammalian societies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 2151–2156.
- Maher CR, Lott DF. 1995. Definitions of territoriality used in the study of variation in vertebrate spacing systems. *Animal Behaviour* **49**: 1581–1597.
- McGregor PK, Bee MA. 2018. Where, who, and when? Key drivers of territorial responses: a comment on Christensen and Radford. *Behavioral Ecology* **29**: 1014–1020.

- Meier PT. 1991. Response of adult woodchucks (*Marmota monax*) to oral-gland scents. *Journal of Mammalogy* **72**: 622-624.
- Moser-Purdy C, Mennill DJ. 2016. Large vocal repertoires do not constrain the dear enemy effect: a playback experiment and comparative study of songbirds. *Animal Behaviour* **118**: 55-64.
- Müller CA, Manser MB. 2007. 'Nasty neighbours' rather than 'dear enemies' in a social carnivore. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 959-965.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2018. vegan: community ecology package. R package version 2.4-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Palphramand KL, White PCL. 2007. Badgers, *Meles meles*, discriminate between neighbour, alien and self scent. *Animal Behaviour* **74**: 429-436.
- Perrin C, Allainé D, Le Berre M. 1993a. Socio-spatial organization and activity distribution of the Alpine marmot *Marmota marmota*: Preliminary Results. *Ethology* **93**: 21-30.
- Perrin C, Coulon J, Le Berre. 1993b. Social behavior of alpine marmots (*Marmota marmota*): seasonal, group, and individual variability. *Canadian Journal of Zoology* **71**: 1945-1953.
- R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.R-project.org/>
- Radford AN. 2005. Group-specific vocal signatures and neighbour-stranger discrimination in the cooperatively breeding green woodhoopoe. *Animal Behaviour* **70**: 1227-1234.
- Radford AN, Christensen C. 2018. Variation in group territorial behavior: a response to comments on Christensen and Radford. *Behavioral Ecology* **29**: 1019-1020.
- Ralls K. 1971. Mammalian scent marking. *Science* **171**: 443-449.
- Raynaud J, Dobson SF. 2011. Scent communication by female Columbian ground squirrels, *Urocitellus columbianus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **65**: 351-358.
- Ridley AR, Mirville MO. 2018. The importance of understanding costs and benefits: a comment on Christensen and Radford. *Behavioral Ecology* **29**: 1018-1019.
- Rosell F, Bjørkøyli T. 2002. A test of the dear enemy phenomenon in the Eurasian beaver. *Animal Behaviour* **63**: 1073-1078.
- Rosell F, Gundersen G, Le Galliard JF. 2008. Territory ownership and familiarity status affect how much male root voles (*Microtus oeconomus*) invest in territory defence. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **62**: 1559-1568.
- Rosell F, Jojola SM, Ingdal K, Lassen BA, Swenson JE, Arnemo JM, Zedrosser A. 2011. Brown bears possess anal sacs and secretions may code for sex. *Journal of Zoology* **283**: 143-152.
- Schulte BA. 1998. Scent marking and responses to male *Castor* fluid by Beavers. *Journal of Mammalogy* **79**: 191-203.

- Scordato ES, Dubay G, Drea CM. 2007. Chemical composition of scent marks in the ringtailed lemur (*Lemur catta*): glandular differences, seasonal variation, and individual signatures. *Chemical Senses* 32: 493–504.
- Setchell JM, Vaglio S, Moggi-Cecchi J, Boscaro F, Calamai L, Knapp LA. 2010. Chemical composition of scent-gland secretions in an old world monkey (*Mandrillus sphinx*): influence of sex, male status, and individual identity. *Chemical Senses* 35: 205–220.
- Shieh G, Jan SL, Randles RH. 2007. Power and sample size determinations for the Wilcoxon signed-rank test. *Journal of Statistical Computation and Simulation* 77: 717–724.
- Siberchicot A, Julien-Laferrière A, Dufour AB, Thioulouse J. 2017. adegraphics: an S4 lattice-based package for the representation of multivariate data. R package version 1.0-9. <https://CRAN.R-project.org/package=adegraphics>.
- Spence-Aizenberg A, Kimball BA, Williams LE, Fernandez-Duque E. 2018. Chemical composition of glandular secretions from a pair-living monogamous primate: sex, age, and gland differences in captive and wild owl monkeys (*Aotus spp.*). *American Journal of Primatology* 80: e22730.
- Stephens PA, Frey-roos F, Arnold W, Sutherland WJ. 2002. Model complexity and population predictions. The alpine marmot as a case study. *Journal of Animal Ecology* 71: 343–361.
- Stoddard PK, Beecher MD, Horning CL, Willis MS. 1990. Strong neighbor-stranger discrimination in song sparrows. *The Condor* 92: 1051–1056.
- Temeles EJ. 1994. The role of neighbours in territorial systems: When are they “dear enemies”? *Animal Behaviour* 47: 339–350.
- Thompson FJ, Cant MA. 2018. Dynamic conflict among heterogeneous groups: a comment on Christensen and Radford. *Behavioral Ecology* 29: 1016–1017.
- Tinnesand HV, Jojola S, Zedrosser A, Rosell F. 2013. The smell of desperadoes? Beavers distinguish between dominant and subordinate intruders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67: 895–904.
- Tinnesand HV, Buesching CD, Nooman MJ, Newman C, Zedrosser A, Rosell F, Macdonald DW. 2015. Will trespassers be prosecuted or assessed according to their merits? A consilient interpretation of territoriality in a group-living carnivore, the European Badger (*Meles meles*). *PloS one* 10: e0132432
- Vaglio S, Minicozzi P, Romoli R, Boscaro F, Pieraccini G, Moneti G, Moggi-Cecchi J. 2016. Sternal gland scent-marking signals sex, age, rank, and group identity in captive mandrills. *Chemical Senses* 41: 177–186.
- Venables WN, Ripley BD. 2002. *Modern applied statistics with S-PLUS*. New York: Springer.
- Walter A. 1990. The evolution of marmot sociality: II. Costs and benefits of joint hibernation. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 27: 239–246.

- Zenuto RR. 2010.** Dear enemy relationships in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: The role of memory of familiar odours. *Animal Behaviour* **79**: 1247–1255.
- Zidat T, Dufour AB, Meiffren G, Gabirot M, Comte G, Allainé D. 2018.** Anal scent gland secretions inform on sexual maturity, sex and social status in the Alpine marmot, *Marmota marmota* (Rodentia: Sciuridae): a role in intrasexual competition in cooperative breeders? *Biological Journal of the Linnean Society* **125**: 229–239.

Chapitre 5

DISCUSSION GENERALE

&

PERSPECTIVES

I. Discussion des résultats et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'étudier le rôle de la communication chimique dans un contexte de sélection sexuelle, ainsi que dans les relations intergroupes chez une espèce sociale ; la marmotte Alpine (*Marmota marmota*). Dans une première partie, j'ai mis en évidence que les sécrétions des glandes anales peuvent renseigner sur la maturité sexuelle des individus, ainsi que sur le sexe et le statut social des individus sexuellement matures (**Article 1** : Zidat *et al.*, 2018). Ceci suggère que les odeurs émises par les glandes anales pourraient être impliquées dans la compétition intrasexuelle, en permettant notamment aux individus dominants d'orienter leur agressivité vers les concurrents appropriés (c'est-à-dire les subordonnés sexuellement matures de même sexe) ; ce qui favoriserait leur suppression de reproduction. Dans une deuxième partie, j'ai montré que les sécrétions des glandes anales peuvent informer sur l'apparement des individus mais pas sur leur génotype au CMH de classe II (**Article 2**). Ces résultats suggèrent que les signaux chimiques peuvent agir comme des signaux efficaces pour l'évaluation du partenaire chez la marmotte Alpine. Dans une dernière partie, j'ai pu mettre en évidence que les marmottes dominantes ne modifient pas leurs comportements exploratoires ou agressifs en fonction de l'origine géographique des intrus, qu'ils soient voisins ou étrangers. De plus, contrairement à notre prédiction selon laquelle les individus subordonnés représentaient une plus grande menace pour les individus dominants, et bien que le statut social soit renseigné dans les sécrétions des glandes jugales, les individus dominants n'étaient pas plus agressifs envers les individus subordonnés intrus (**Article 3**). Il semble donc que chez la marmotte Alpine, tout individu extérieur au groupe social est traité comme un intrus.

I.1. Odeurs et caractéristiques individuelles

I.1.1. *Signatures chimiques du sexe et de la maturité sexuelle*

Dans l'**Article 1** de ma thèse j'ai mis en évidence que les sécrétions des glandes anales informent sur des caractéristiques individuelles telles que le sexe et le statut de maturité sexuelle chez la marmotte Alpine (Zidat *et al.*, 2018). Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés dans la littérature. En effet, il a été démontré que l'odeur peut informer sur le sexe des individus chez de nombreux taxa : les reptiles (e.g. García-Roa *et al.*, 2016), les oiseaux (e.g. Whittaker *et al.*, 2010; Leclaire *et al.*, 2011; Amo *et al.*, 2012), ou encore chez les mammifères comme, par exemple, chez les primates (e.g. MacDonald *et al.*, 2008; Setchell *et al.*, 2010; Vaglio *et al.*, 2016; Spence-Aizenberg *et al.*, 2018), l'ours brun (*Ursus arctos*; Rosell *et al.*, 2011), la loutre d'Europe (*Lutra lutra*; Kean, Müller, & Chadwick, 2011), ou encore l'échidné (*Tachyglossus aculeatus*; Harris *et al.*, 2014). L'odeur peut également informer sur le statut de maturité sexuelle chez de nombreuses espèces (e.g. MacDonald *et al.*, 2008; Kean *et al.*, 2011; Linklater, Mayer, & Swaisgood, 2013; Vaglio *et al.*, 2016; Spence-Aizenberg *et al.*, 2018).

I.1.2. *Signature chimique du statut social*

Au travers de mes différents résultats de thèse j'ai également mis en évidence que les sécrétions des glandes anales et jugales renseignaient sur le statut social des marmottes Alpine adultes (Zidat *et al.*, 2018; **Article 3**). Des résultats similaires ont été trouvés chez d'autres espèces (e.g. Burgener *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010; Tinnesand *et al.*, 2013; Fernald, 2014). En effet, les hiérarchies de dominance sont omniprésentes chez les espèces sociales et servent à organiser les systèmes sociaux (Fernald, 2014). Cependant, bien qu'il y avait une différence de composition chimique entre les individus subordonnés et les individus dominants (**Articles 1 et 3**), cette information ne semble pas être utilisée par les individus dans un contexte de défense du territoire. En effet, les individus dominants ne semblent pas discriminer le statut social des odeurs d'individus intrus qu'on leur présente (**Article 3**). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'information existe mais qu'elle n'est pas perçue par les marmottes, ou que ces dernières ne l'utilisent pas car subordonné ou

dominant, un intrus reste une menace potentielle. Il est donc possible que cette information ne soit alors utilisée uniquement dans un contexte de compétition intrasexuelle intragroupe (Zidat *et al.*, 2018) plutôt que dans un contexte de défense du territoire.

I.1.3. Une multi-source d'odeurs pour des contextes différents ?

Au vu de ces résultats, je pense qu'il serait intéressant de regarder si ces informations (i.e. le statut de maturité sexuelle, le sexe et le statut de dominance) sont également retrouvées dans les sécrétions des autres glandes que possède la marmotte Alpine. En effet, chez la plupart des espèces de mammifères, les individus utilisent plusieurs sources d'odeurs pour communiquer (Müller-Schwarze, 1971; Albone, 1984; Brown & Macdonald, 1985). Johnston et ses collaborateurs ont mis en évidence, chez le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) notamment, qu'il existait des informations distinctes produites par des endroits spécifiques du corps (i.e. urine, fèces, sécrétions vaginales, glandes auriculaires et glandes situées au niveau des flancs ; Johnston *et al.*, 1993; Johnston, 2003), et ont suggéré que certaines de ces sources d'odeurs avaient été sélectionnées pour leurs différences singulières au cours de l'évolution (Johnston *et al.*, 1993; Johnston & Robinson, 1993). Par exemple, seules les sécrétions des glandes vaginales et des glandes situées au niveau des flancs ne renseignent sur le statut de reproduction des hamsters doré (Johnston, 2003). De plus, des résultats similaires ont été obtenus par la même équipe chez d'autres espèces de rongeurs, le hamster de Campbell (*Phodopus campbelli*) et le campagnol des prés (*Microtus pennsylvanicus*) (Ferkin & Johnston, 1993, 1995a,b; Ferkin *et al.*, 1994; Lai & Johnston, 1994; Lai, Vasilieva, & Johnston, 1996; Johnston, 2003). Des études plus récentes ont également mis en évidence que des odeurs de sources différentes au sein d'une même espèce présentaient des compositions chimiques spécifiques, comme par exemple chez le maki catta (*Lemur catta* ; Scordato, Dubay, & Drea, 2007) ou encore chez l'échidné (*Tachyglossus aculeatus* ; Harris *et al.*, 2014). Il semble alors probable que la plupart des rongeurs et autres mammifères aient des sources d'odeurs distinctes localisées à des endroits spécifiques du corps contenant des informations différentes. Ainsi, l'existence de différents types de glandes odorantes chez de nombreuses espèces de mammifères,

associée à des observations comportementales, suggère une utilisation contexte-dépendant de chaque glande par les individus (Albone, 1984; Brown & Macdonald, 1985).

Il est également possible que différentes glandes renseignent sur une même information : Harris *et al.* (2014) ont analysés les sécrétions des trois glandes odorantes que possède l'échidné et ont mis en évidence que ces trois glandes renseignent sur le sexe des individus, bien que chacune d'entre elle possède une composition chimique qui lui est propre. Il serait donc intéressant de faire de même chez la marmotte Alpine afin de voir si les informations contenues dans les différentes glandes sont redondantes ou distinctes. [Je possède d'ors et déjà les données chimiques pour les sécrétions des glandes anales et jugales, et les échantillons des sécrétions des glandes buccales ont déjà été analysés en chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.] Il est déjà possible de dire que les compositions chimiques des sécrétions des glandes jugales, en plus d'informer sur le statut social, sont différentes entre sexes, mais que l'interaction entre le statut social et le sexe n'est pas significative (sexe : pseudo-F $F_{1,68} = 3.44$, $P < 0.001$; statut social : pseudo-F $F_{1,68} = 2.07$, $P < 0.05$; interaction : pseudo-F $F_{1,68} = 1.34$, $P = 0.17$, contrairement à ce qui a été observé pour les sécrétions des glandes anales; **Fig.31**). Il serait néanmoins nécessaire de faire des expériences comportementales afin de vérifier que ces informations sont bien perçues par les marmottes et qu'elles y répondent. Ceci pourrait montrer que les sécrétions chimiques des glandes odorantes ne sont pas uniquement des indices (« cues » en anglais), mais bel et bien des signaux chimiques utilisés par les marmottes Alpines pour communiquer entre elles. Cela permettrait également d'avoir une meilleure compréhension du rôle de la communication chimique dans les interactions sociales et sexuelles chez cette espèce.

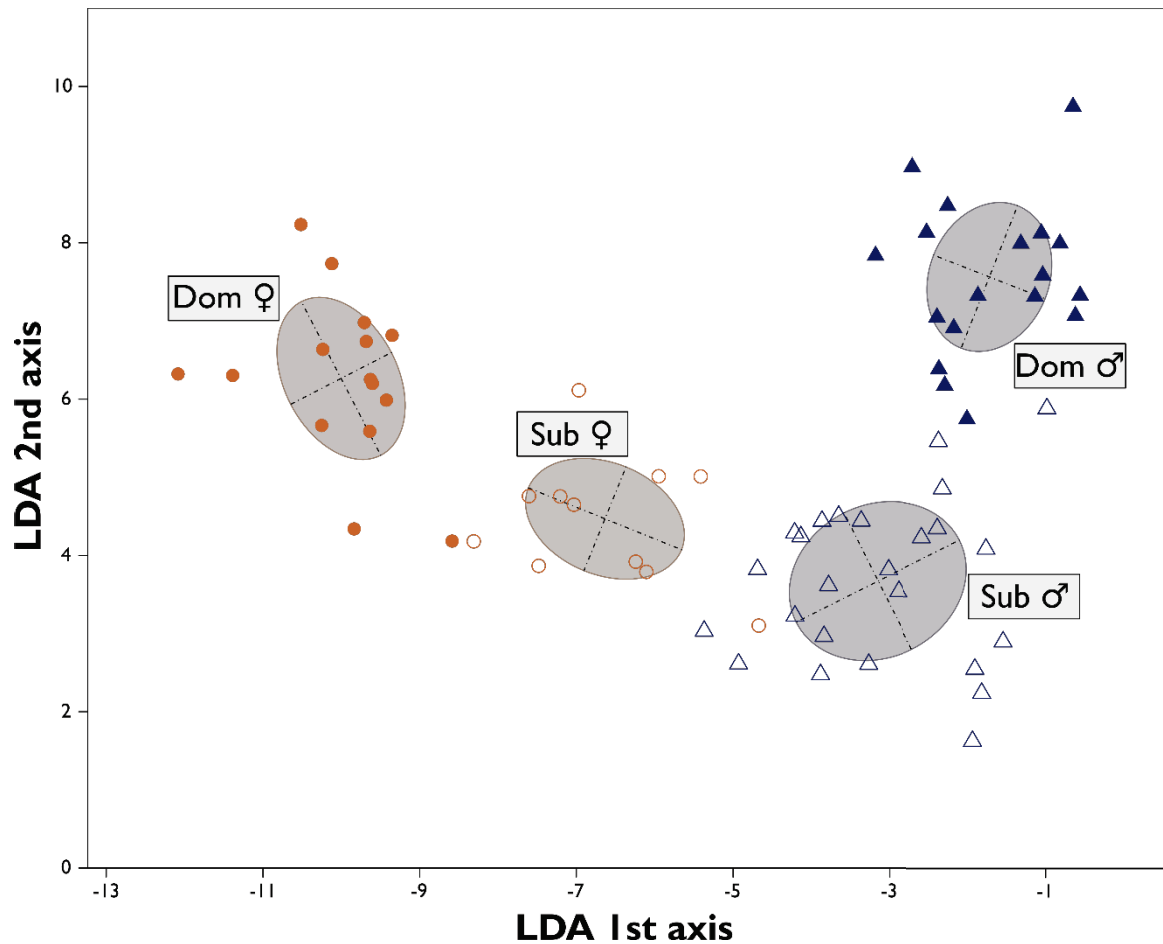


Figure 31 : Premier plan factoriel de l'analyse discriminante linéaire (LDA) séparant les individus adultes en fonction de leur sexe et de leur statut social à partir des sécrétions des glandes jugales. Sexe: les mâles sont représentés par des triangles et les femelles par des cercles. Statut social: les individus dominants (Dom) sont représentés par des symboles pleins et les individus subordonnés (Sub) par des symboles ouverts.

I.2. Odeurs et groupe social

I.2.1. Signature chimique du génotype

Dans l'**Article 2** de ma thèse j'ai mis en évidence que les sécrétions des glandes anales renseignent sur le génotype chez les marmottes Alpines adultes. Cette signature du génotype peut intervenir lors du choix de partenaire et permettre aux femelles de choisir des partenaires extra-couple plus compatibles (i.e. non apparentés) que leur partenaire social (suggéré par Cohas *et al.*, 2008; Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). Cette corrélation entre la distance chimique et la distance génétique est également retrouvée chez d'autres espèces (e.g. Liu *et al.*, 2008; Leclaire *et al.*, 2011; Zhang & Zhang, 2011; Stoffel *et al.*, 2015; Potier *et al.*, 2018), y compris chez des espèces sociales (Charpentier, Boulet, & Drea, 2008; Boulet, Charpentier, & Drea, 2009; Morelli *et al.*, 2013), et à reproduction coopérative (Sun & Müller-Schwarze, 1998a). Cependant, les études portant sur les espèces sociales ont mis en évidence que l'odeur contenait des informations sur le génotype des individus uniquement pendant la saison de reproduction (Charpentier *et al.*, 2008; Boulet *et al.*, 2009). A ma connaissance, c'est la première fois qu'il est montré que l'odeur renseigne sur le génotype des individus chez une espèce à reproduction coopérative en dehors de la période de reproduction.

I.2.2. Une reconnaissance des familiers ?

Cette signature chimique du génotype chez la marmotte Alpine retrouvée même en dehors de la période de reproduction suggère qu'elle pourrait avoir un rôle autre que l'évitement des apparentés lors du choix de partenaire (**Article 2**). En effet, la marmotte Alpine étant une espèce sociale, il est possible que cette signature chimique du génotype, présente tout au long de l'année, puisse intervenir dans les interactions sociales intra et intergroupes. Outre une reconnaissance du degré d'apparentement (Busquet & Baudoin, 2005), une reconnaissance des familiers (i.e. les individus appartenant au même groupe social) est attendue en particulier chez les espèces sociales (e.g. Rubenstein & Hack, 1992; Drea *et al.*, 2002; Krueger & Flaucher, 2011; Henkel *et al.*, 2015; Gilfillan *et al.*, 2017). En effet,

reconnaître les individus de sa propre famille est primordial pour la cohésion des groupes sociaux et leur stabilisation dans le temps. Chez la marmotte Alpine, n'importe quel individu étranger au groupe familial semble être considéré comme un intrus à chasser (**Article 3**), ce qui signifierait que l'information d'intérêt dans ce contexte de défense du territoire serait plutôt la reconnaissance d'individu étranger à la famille. On pourrait donc s'attendre à ce que les individus puissent faire la distinction entre des individus familiers et des individus non-familiers. De plus, il a déjà été montré chez une autre espèce à reproduction coopérative, le castor du Canada (*Castor Canadensis*), que l'odeur pouvait renseigner sur le groupe d'appartenance des individus (Sun & Müller-Schwarze, 1998b). Mais alors, les marmottes Alpines sont-elles réellement capables d'identifier les individus étrangers au groupe social via les odeurs? Pour tenter de répondre à cette question j'ai réalisé des expériences comportementales en présentant une odeur d'un individu familier *vs* une odeur d'un individu non-familier étranger. Dans ce cas, un individu non-familier étranger est défini comme un individu appartenant à un groupe social dont les limites de territoire ne sont pas communes au groupe cible. [Les expériences ont été réalisées et filmées pendant les sessions de terrain de 2017 et 2018 (voir **Annexe 3** pour le protocole détaillé). Les vidéos ont d'ores et déjà été traitées mais les analyses statistiques restent à venir.] Je m'attends à ce que les marmottes Alpine reconnaissent les odeurs des membres de leur groupe familial, et que les membres des groupes familiaux soient plus agressifs envers les odeurs des individus non-familiers (e.g. Gosling & McKay, 1990; Luque-Larena, López, & Gosálbez, 2001; Linklater & Swaisgood, 2008).

Chez la marmotte Alpine les membres d'un groupe familial sont généralement apparentés, exception faite lorsqu'il y a un changement de dominant. Mais alors, comment ce nouvel arrivant non-apparenté peut-il quand même être reconnu comme membre du groupe social? Cette question suggère que, en plus de renseigner sur la parenté des individus, il est possible que l'odeur ait une signature familiale reconnaissable par l'ensemble du groupe social. Par exemple, chez le castor du Canada (*Castor Canadensis*), l'odeur des glandes anales peut à la fois contenir des informations sur la parenté mais aussi sur le groupe d'appartenance des individus (Sun & Müller-Schwarze, 1998a,b). Comme suggéré chez d'autres mammifères sociaux, cette signature chimique

familiale devrait être flexible et pourrait être liée à la présence de bactéries contenues dans les sécrétions des glandes odorantes (e.g. Bloss *et al.*, 2002; Buesching, Stopka, & MacDonald, 2003; Safi & Kerth, 2003; Burgener *et al.*, 2008; Theis *et al.*, 2008).

I.2.3. Des odeurs sociales d'origine bactérienne?

La variation des signaux chimiques des mammifères peut être due, au moins en partie, à une variation de la composition ou de la structure des communautés bactériennes génératrices d'odeurs qui sont présentes dans les sécrétions des glandes odorantes (l'hypothèse de la fermentation ; Albone, 1984; Archie & Theis, 2011; Ezenwa & Williams, 2014). L'hypothèse de la fermentation stipule que les communautés bactériennes peuvent influencer l'odeur de leur hôte en produisant directement des composés chimiques ou en dégradant des composés produits par l'hôte. En effet, les glandes odorantes étant des milieux chauds, humides, riches en matière organique et en grande partie anaérobies, elles sont propices à la prolifération des bactéries symbiotiques fermentaires (Albone, Gosden, & Ware, 1977). Les bactéries vont alors fermenter les substrats riches en protéines et en lipides des sécrétions des glandes odorantes, et les dégrader en des composés chimiques qui feront alors partie du bouquet odorant de leur hôte (Albone *et al.*, 1977; Archie & Theis, 2011; Ezenwa & Williams, 2014). Ainsi, chez l'Homme par exemple, les aisselles sont chargées de sécrétions glandulaires qui ne deviennent odorantes qu'après leur dégradation par les bactéries (James *et al.*, 2013). Les signatures chimiques familiales pourraient alors être dues au fait que les membres d'un même groupe social hébergent dans leurs sécrétions odorantes des communautés bactériennes proches qui produiraient ainsi des odeurs plus similaires entre membres d'un même groupe social qu'entre membres de groupes différents. En effet, les membres d'un même groupe social partagent un même espace (e.g. un même terrier) et ont généralement des contacts corporels fréquents, ce qui pourrait permettre une homogénéisation de leurs communautés bactériennes, expliquant ainsi que des individus d'un même groupe social aient des communautés bactériennes plus similaires qu'entre individus de groupes voisins (Albone, 1984; Archie & Theis, 2011; Ezenwa & Williams, 2014).

Bien que les communautés bactériennes puissent être façonnées par plusieurs facteurs, tels que le génotype, la physiologie, le régime alimentaire et les relations sociales de leur hôte (e.g. Voigt, Caspers, & Speck, 2005; Lanyon *et al.*, 2007; White *et al.*, 2010; van Dongen *et al.*, 2013), les différences de compositions bactériennes des sécrétions des glandes odorantes entre individus pourraient produire des signatures chimiques familiales susceptibles d'intervenir lors des interactions sociales. En effet, de récentes études ont mis en évidence que la composition des communautés bactériennes provenant de sécrétions de glandes odorantes covariait avec la composition chimique de ces mêmes sécrétions chez la hyène tachetée (*Crocuta crocuta* ; Theis, Schmidt, & Holekamp, 2012; Theis *et al.*, 2013), le suricate (*Suricata suricatta* ; Leclaire, Nielsen, & Drea, 2014), mais également chez le blaireau Européen (*Meles meles* ; Buesching *et al.*, 2016). Il serait donc intéressant de voir si chez la marmotte Alpine cette même covariance existe, ce qui permettrait de comprendre l'origine de la signature chimique familiale qui semble exister chez cette espèce. [Pour cela j'ai échantillonné les sécrétions de glandes anales de l'ensemble des marmottes Alpine capturées en 2017. Je possède d'ores et déjà les données de compositions bactériennes, les analyses moléculaires du microbiote ayant été faites en collaboration avec Sarah Leclaire (Laboratoire Evolution & Diversité Biologique, Toulouse), et les données chimiques sont encore en cours d'analyse.]

I.3. Odeurs et Complexe Majeur d'Histocompatibilité

I.3.1. Signature chimique du génotype au CMH de classe II

Dans l'**Article 2** de ma thèse je n'ai pas réussi à mettre en évidence une signature chimique du génotype au CMH chez la marmotte Alpine bien qu'il semblerait que les femelles préfèrent les mâles les plus dissimilaires au CMH de classe II (suggéré par Ferrandiz-Rovira *et al.*, 2016). Pourtant, chez de nombreuses espèces, la compatibilité au CMH est évaluée par des signaux chimiques (Penn, 2002). Par exemple, les rongeurs, les oiseaux, les lézards et les primates, y compris les humains, préfèrent l'odeur d'individus dissimilaires au CMH (e.g. Wedekind *et al.*, 1995; Olsson *et al.*, 2003; Radwan, Tkacz, & Kloch, 2008; Setchell *et al.*, 2010a; Leclaire *et al.*, 2017). Bien que peu d'études n'aient mis en évidence ce lien entre composition chimique et génotype au CMH (Knapp, Robson, &

Waterhouse, 2006; Setchell *et al.*, 2011; Leclaire *et al.*, 2014a; Slade *et al.*, 2016), on pourrait alors s'attendre à retrouver ce même patron chez la marmotte Alpine. Cette absence de résultat pourrait être due à notre faible taille d'échantillon ($N=23$). Il serait donc nécessaire d'augmenter cette taille d'échantillon. [Les données chimiques sont déjà acquises et les échantillons biologiques (poils et biopsie) sont en cours de séquençage.] Il est également possible que l'information soit contenue dans une autre source d'odeur, d'où la nécessité d'étudier les autres glandes odorantes que possède la marmotte Alpine. Pour finir, cette absence de résultats pourrait être également dû au fait que la collecte des échantillons se soit faite en dehors de la période de reproduction, et que le génotype au CMH ne soit exprimé uniquement pour son rôle lors du choix de partenaire.

I.3.2. Quel rôle du microbiote ?

Chez les vertébrés, en parallèle des effets d'autres gènes, du régime alimentaire, de l'état hormonal et des infections parasitaires, une partie du profil chimique est associée au CMH (Restrepo *et al.*, 2006; Kwak *et al.*, 2010). Cependant, chez la plupart des espèces, le mécanisme par lequel les gènes du CMH influencent l'odeur n'est pas encore clairement défini (Penn, 2002; Restrepo *et al.*, 2006). Le CMH est un groupe de gènes qui codent pour des protéines de surface cellulaire (molécules du CMH de classe I et II). Les protéines de CMH de classe I se lient aux peptides antigènes intracellulaires (e.g. les virus) alors que les molécules de CMH de classe II se lient aux peptides antigènes extracellulaires (e.g. les bactéries). Plusieurs hypothèses ont alors été suggérées pour tenter d'expliquer l'influence des gènes du CMH sur l'odeur (Penn & Potts, 1998; Penn, 2002). Par exemple, les gènes du CMH pourraient modifier les odeurs via les molécules odorantes du CMH elles-mêmes ou via des peptides odorants (antigènes) qui se lieraient aux molécules du CMH, comme montré chez l'Homme et le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Hinz *et al.*, 2013; Milinski *et al.*, 2013). Cependant, sachant que les bactéries influencent l'odeur individuelle selon l'hypothèse de la fermentation comme définie plus haut (Archie & Theis, 2011), les odeurs dépendantes du CMH sont supposées provenir indirectement de métabolites produits par la communauté bactérienne selon l'hypothèse de la microflore (« *microflora hypothesis* » en anglais ; Penn & Potts, 1998). L'hypothèse de la microflore précise que les gènes du CMH

d'un individu peuvent modifier son odeur en formant des populations de microorganismes commensaux spécifiques aux allèles du CMH portés par les individus.

Le CMH de classe II attire alors particulièrement l'attention. En effet, chez de nombreuses espèces le choix de partenaire via les odeurs semble cibler les allèles de classe II du CMH, par opposition aux allèles de classe I (e.g. Ekblom et al., 2004; Setchell et al., 2010a; Strandh et al., 2012; Sin et al., 2015; Ferrandiz-Rovira et al., 2016). Sachant que les protéines de CMH de classe I et de classe II ont des cibles différentes (respectivement des pathogènes intracellulaires, principalement des virus et des pathogènes extracellulaires, principalement des bactéries), il est plausible que les gènes au CMH de classe II sélectionnent une certaine communauté bactérienne qui produirait ainsi une odeur particulière (« *microflora hypothesis* »), en dégradant les protéines de CMH (Archie & Theis, 2011). Les gènes du CMH pourraient alors contrôler la composition chimique des odeurs indirectement en formant des populations spécifiques de flore microbienne commensale des individus produisant des odeurs dépendantes du CMH. Cependant, cette hypothèse selon laquelle l'odeur peut transmettre des informations sur les caractères du CMH par le biais des communautés bactériennes a rarement été testée, et les résultats restent jusqu'à présent très mitigés (Singh et al., 1990; Yamazaki et al., 1990; Schellinck, Brown, & Slotnick, 1991; Schellinck et al., 1991). En revanche, deux études très récentes réalisées sur des oiseaux marins ont mis pour la première fois en évidence qu'il existait un lien entre le génotype au CMH de classe II et la composition des communautés bactériennes présentes au niveau de sources d'odeur (chez l'océanite cul-blanc, *Oceanodroma leucorhoa* ; Pearce et al., 2017, et chez le pétrel bleu, *Halobaena caerulea* ; Leclaire et al., 2019).

I.3.2. Micro-extraction sur phase solide (SPME) : une technique plus appropriée ?

Les bactéries peuvent dégrader les protéines du CMH qui sont généralement trop volumineuses pour être volatiles, et produire des composés plus petits donc plus volatiles (Schulz & Dickschat, 2007). Il est alors possible que la technique d'extraction par solvant, couplée à une analyse en chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse ne permette pas d'avoir l'intégralité de la composition chimique des sécrétions. En effet, bien que l'extraction au solvant soit la méthode la plus couramment utilisée, elle ne permet pas

d'extraire les composés les plus volatiles potentiellement déjà diffusés dans l'air avant que le prélèvement ne soit réalisé (Schulz & Dickschat, 2007). De plus, étant donné qu'il n'existe pas de solvant universel (ou de mélange de solvants) capable d'extraire la totalité des composés polaires et apolaires⁴, l'extraction par solvant entraîne inévitablement une perte qualitative partielle de certains composés chimiques présents dans les sécrétions (Gabirot et al., 2016). Néanmoins, l'extraction par solvant permet généralement d'obtenir un profil chimique plus complet. Cependant, les chromatogrammes obtenus sont plus complexes et donc plus compliqués à analyser (Gabirot et al., 2016). Une solution pour réussir à capter les composés les plus volatiles potentiellement produits par fermentation bactérienne serait alors de coupler cette technique d'extraction par solvant avec une micro-extraction sur phase solide (SPME ; de Fátima Alpendurada, 2000; Gabirot et al., 2016). En effet, utiliser une fibre SPME permettrait d'extraire les composés les plus volatiles potentiellement absents des profils chimiques obtenus par extraction par solvant, mais permettrait également d'obtenir des profils chimiques moins complexes (Gabirot et al., 2016). Il serait alors peut-être davantage possible de lier certains composés particuliers avec les caractéristiques du CMH en utilisant cette méthode.

⁴ Une molécule est un assemblage chimique de plusieurs atomes reliés entre eux par des liaisons chimiques (liaisons covalentes). Ces liaisons peuvent être polaires ou apolaires en fonction du type d'atome constituant cette molécule. Si la nature des atomes permet une répartition uniforme des électrons alors la molécule sera apolaire. A l'inverse, si la nature des atomes provoque une répartition des électrons qui n'est pas uniforme, c'est-à-dire que la présence d'un atome plus électronégatif attire les électrons vers lui, alors la molécule sera polaire. C'est donc la nature, et par conséquent l'électronégativité des atomes qui composent la molécule qui vont définir la répartition de ces charges dans l'espace et va lui donner son caractère polaire ou apolaire.

II. Changement climatique et communication chimique chez la marmotte Alpine : quelle évolution future ?

Les rongeurs ont fait l'objet d'études approfondies en laboratoire en tant qu'espèces modèles afin de mieux comprendre la communication chimique chez les mammifères et, dans certains cas, afin de développer des paradigmes en biologie comportementale chez les mammifères (e.g. Johnston, 2003; Mateo, 2003; Arakawa *et al.*, 2008; Hurst, 2009; Hurst & Beynon, 2010). Cependant, l'environnement de laboratoire présente des limites pouvant compromettre les résultats, les inférences, ainsi que l'application à la théorie de l'évolution et à l'histoire naturelle de l'espèce (Wolff, 2003). En effet, Wolff (2003) a revisité plusieurs domaines de recherche étudiés en laboratoire qui n'avaient encore jamais été testés sur le terrain ou qui, lorsqu'ils étaient testés, n'étaient jusqu'alors pas les résultats de laboratoire. Cela concerne notamment des études portant sur le marquage olfactif et le choix du partenaire. Wolff (2003) conclut alors que les rongeurs sont certes d'excellentes espèces modèles pour tester des hypothèses en écologie comportementale, mais que la réalisation d'études en milieu naturel est indispensable pour améliorer la confiance que l'on pourrait avoir dans les résultats issus d'études réalisées en laboratoire. Lors de ma thèse j'ai étudié une population naturelle de marmottes Alpines ce qui me permet d'avoir des résultats représentatifs de ce qu'il se passe réellement en milieu naturel. En effet, les populations naturelles sont soumises à de nombreux facteurs environnementaux et pressions de sélection difficilement reproductibles en laboratoire. En effet, le changement climatique ainsi que les perturbations anthropiques peuvent affecter les populations naturelles et modifier les comportements animaux ainsi que leur communication.

II.1. Une restructuration des groupes sociaux chez la marmotte Alpine

Chez le genre *Marmota*, l'hibernation est généralement considérée comme une condition préalable à l'évolution de la socialité (Armitage, 1999, 2017). Les conditions environnementales hostiles ont favorisé le retard de dispersion des jeunes et donc la formation de groupes sociaux. En effet, la période d'activité étant relativement courte

chez ces espèces (seulement 6 mois de l'année), les jeunes n'ont généralement pas le temps d'acquérir assez de ressources, et donc une taille suffisante pour supporter les coûts liés à la dispersion, et restent donc dans leur groupe natal au moins les deux premières années de leur vie (scénario d'évolution de la socialité chez le genre *Marmota* suggéré par Armitage, 1999). Par conséquent, plus les conditions environnementales sont rudes, plus le niveau de socialité des espèces est élevé au sein du genre *Marmota*. Chez la marmotte Alpine, on sait maintenant que la présence de ces auxiliaires dans les groupes familiaux augmente la survie moyenne des jeunes du groupe grâce à leur rôle dans la thermorégulation sociale lors de la période d'hibernation (Allainé *et al.*, 2000; Allainé & Theuriau, 2004). Cependant, une étude récente a mis en évidence que la survie moyenne des jeunes a diminué ces dernières années du fait d'hivers plus rudes et ce, même dans les groupes possédant des auxiliaires (Rézouki, 2018). Les modifications des conditions hivernales provoquées par le changement climatique, c'est-à-dire l'apparition d'hivers plus froids et une diminution de l'épaisseur de neige qui altère l'isolation des terriers, semblent alors diminuer les bénéfices apportés par ces auxiliaires (Rézouki, 2018). En conséquence, cette étude a également montré que la taille moyenne des groupes tend à diminuer et que la probabilité d'accéder à la dominance, et donc à la reproduction, tend à augmenter ces dernières années pour les subordonnés (Rézouki, 2018). Le changement climatique serait donc entrain de modifier complètement la structure sociale des groupes sociaux chez la marmotte Alpine dont la population est désormais constituée de groupes familiaux plus petits et plus nombreux (Rézouki, 2018). Il est alors possible de se demander si ces modifications ne pourraient pas affecter les relations entre les individus. En effet, on pourrait s'attendre à une compétition intrasexuelle intragroupe plus faible en raison d'un coût à la dispersion plus faible, et par conséquent s'attendre à une compétition intrasexuelle intergroupes plus intense. De plus, les conflits entre groupes voisins pourraient également devenir plus fréquents avec des niveaux d'agressivité plus forts ; les territoires devenant plus petits, il devient alors primordial de les défendre. Cette modification de l'organisation sociale chez la marmotte Alpine que semble provoquer le changement climatique pourrait donc avoir un fort impact sur les interactions sociales et par conséquent sur la communication chimique elle-même.

II.2. La vie sociale va de pair avec la communication

II.2.1. L'hypothèse de la complexité sociale pour la communication

L'hypothèse de la complexité sociale pour la communication établit que la socialité peut être un moteur évolutif à l'évolution de la complexité de la communication. En d'autres termes, il existe un lien entre la socialité et la communication ; une modification de la structure sociale (i.e. la complexité sociale) pourrait engendrer une modification de la communication (i.e. la complexité de la communication) nécessaire à la gestion des interactions sociales qui en émergent (Freeberg, 2006; Freeberg, Dunbar, & Ord, 2012a; Freeberg, Ord, & Dunbar, 2012b; Krams *et al.*, 2012). Ainsi, l'hypothèse de la complexité sociale pour la complexité de la communication postule que les systèmes de signalisation des animaux vivant dans des groupes sociaux plus complexes seront plus complexes (Freeberg *et al.*, 2012a; Peckre, Kappeler, & Fichtel, 2019). En effet, les individus vivant en groupes sont généralement impliqués dans un large éventail d'interactions avec divers partenaires sociaux, ce qui déclenche finalement la nécessité de transmettre une plus grande diversité d'informations et d'exprimer un plus large éventail d'états (Lamarck, 1809; Marler, 1977; Freeberg *et al.*, 2012a; Ord & Garcia-Porta, 2012).

La complexité sociale est difficile à définir et aucune définition ne fait, pour le moment, consensus dans la littérature (résumé dans Peckre *et al.*, 2019). Freeberg *et al.* (2012a) proposent de définir les systèmes sociaux complexes comme étant « *des groupes dans lesquels les individus interagissent fréquemment avec plusieurs individus différents, dans des contextes différents, et souvent de manière répétée au cours du temps* ». Un élément ressort alors dans cette définition : l'importance du nombre et du type d'interactions présents entre les individus (Freeberg *et al.*, 2012a ; mais voir aussi Kappeler, 2019). Plus récemment, Bergman & Beehner (2015) explicitent cette importance des interactions sociales en définissant la complexité sociale comme étant « *le nombre de relations différenciées entre les individus* ». Par conséquent, dans les systèmes sociaux complexes les individus interagissent fréquemment entre eux, dans de nombreux contextes différents et avec des individus différents, et peuvent interagir de manière répétée avec plusieurs mêmes individus appartenant au groupe social focal ou aux groupes sociaux voisins.

II.2.2. *Le cas des Sciuridés*

La vie sociale va de pair avec la communication, et la manière dont la complexité sociale et la complexité de la communication évoluent en parallèle est une question centrale en écologie comportementale. Les rongeurs *Sciuridés* (i.e. écureuils terrestres, chiens de prairie, marmottes) ont particulièrement été étudiés pour répondre à cette question car ils constituent un excellent système modèle pour plusieurs raisons (résumé dans Pollard & Blumstein, 2012). D'abord, les *Sciuridés* constituent un clade spécifique qui présente un large éventail de structures sociales, avec aux extrémités du spectre, des espèces solitaires, comme par exemple *M. monax*, et des espèces très sociales, comme par exemple la marmotte Alpine, *M. marmota* (Blumstein & Armitage, 1999), mais aussi avec des tailles de groupe et une cohésion de groupe très variables. Par conséquent, les *Sciuridés* présentent des niveaux de complexité sociale très variés (Armitage, 1981; Michener, 1983). Des études ont montré que la complexité des rôles socio-démographiques prédit la taille du répertoire des cris d'alarme, alors que la taille du groupe social prédit la signature individuelle des cris d'alarme (Blumstein & Armitage, 1997; Pollard & Blumstein, 2011, 2012).

II.2.2.1. *Rôles socio-démographiques et complexité des cris d'alarme*

Blumstein & Armitage (1997) ont utilisé 22 espèces de *Sciuridés* pour tester le lien qu'il pourrait y avoir entre la complexité sociale (dans leur étude, la complexité des rôles socio-démographiques) et un attribut de complexité de communication (dans leur étude, la taille du répertoire des cris d'alarme). Ils définissent les rôles socio-démographiques comme étant des « *patrons de comportements sociaux attendus, généralement déterminés par le statut de l'individu dans une société donnée* » (e.g. reproducteur *vs* non-reproducteur, subordonné *vs* dominant, mâle *vs* femelle, et ainsi de suite). Ils se sont focalisés sur les cris d'alarme car il est connu que certaines espèces sociales utilisent plusieurs types de cris d'alarme différents pour communiquer aux autres membres du groupe soit la présence d'un certain type de prédateurs (e.g. Slobodchikoff, Paseka, & Verdolin, 2009), soit le degrés de risque ou d'urgence de la menace (e.g. Hollén & Manser, 2007), soit les deux (e.g. Manser, 2001; Manser, Seyfarth, & Cheney, 2002). Ils ont ainsi mis en évidence que

la complexité des rôles socio-démographiques explique de manière significative la variation de la taille du répertoire des cris d'alarme. Une augmentation du nombre de rôles socio-démographiques semblerait donc renforcer la capacité de communication via un répertoire plus vaste et plus complexe de cris d'alarme.

II.2.2.2. Taille de groupe et signature individuelle des cris d'alarme

En comparant la signature individuelle des cris d'alarme avec la taille des groupes sociaux chez huit espèces de *Sciuridés*, Pollard & Blumstein (2011) ont pu mettre en évidence que la taille du groupe social explique plus de 88% de la variation de la signature individuelle des cris d'alarme. La taille du groupe expliquerait donc cette forte variation trouvée entre les cris d'alarme d'individus différents (i.e. signature de l'individu) et semblerait alors conduire à l'évolution des signatures individuelles.

II.3. Quels attendus chez la marmotte Alpine ?

Nous avons vu que le changement climatique semble affecter la structure sociale de la marmotte Alpine en diminuant la taille des groupes sociaux et en favorisant l'accès à la reproduction des subordonnés (Rézouki, 2018). Par conséquent, au vu des résultats précédents, il est possible que le changement climatique provoque dans l'avenir une modification de la communication chimique chez cette espèce sociale. La diminution de la taille des groupes pourrait provoquer une diminution de la variabilité individuelle des signaux odorants. En effet, la reconnaissance individuelle sera plus facile dans des groupes plus petits, il ne sera donc plus nécessaire d'avoir un large panel de signatures individuelles et cela pourrait alors provoquer une diminution de la richesse spécifique des sécrétions odorantes des marmottes Alpines. De plus, l'accès à la reproduction étant favorisée, on pourrait s'attendre à ce qu'il n'y ait plus de bénéfices pour les subordonnés à rester dans leur groupe natal. Les groupes sociaux pourraient alors devenir de plus en plus petits, mais plus nombreux, jusqu'à ce qu'ils ne soient composés plus que d'un couple de reproducteurs et de leurs petits de l'année. Le nombre de rôles socio-démographiques pourrait alors diminuer car il n'y aurait plus de non-reproducteurs, et il ne serait plus nécessaire que les sécrétions odorantes renseignent sur le statut social des individus. Le

changement climatique, en affectant l'organisation sociale des marmottes Alpines, pourrait donc modifier complètement la communication chimique chez cette espèce, mais également les autres canaux de communication.

III. Quid des autres canaux de communication ?

La majorité des animaux utilise plusieurs canaux de communication pour communiquer entre eux (Higham & Hebets, 2013). Darwin le soulignait déjà dans son livre *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872), pourtant l'étude de la communication multimodale n'a commencé à voir le jour que récemment (Rowe & Guilford, 1996). La communication multimodale se fait par une combinaison de plusieurs signaux sensoriels différents, comme par exemple, les signaux visuels, acoustiques ou olfactifs (Higham & Hebets, 2013). Les animaux peuvent alors utiliser ce type de communication soit pour augmenter la clarté du message émis par l'utilisation de signaux redondants, soit pour augmenter la précision de l'information transmise (e.g. Hebets & Papaj, 2005; Partan & Marler, 2005; Ay, Flack, & Krakauer, 2007; Wilgers & Hebets, 2011; Higham & Hebets, 2013; Stafstrom & Hebets, 2013).

L'utilisation d'une communication multimodale par les animaux peut ainsi leur permettre de répondre à un environnement changeant. En effet, le changement climatique, tout comme l'urbanisation, provoque des modifications rapides de l'environnement ce qui peut perturber la transmission des signaux, et ce peu importe le canal de communication utilisé (Partan, 2013). Par exemple, le changement climatique peut provoquer une perturbation de la communication chimique en modifiant la température, le vent ou encore l'humidité. En effet, des températures plus élevées peuvent augmenter la volatilité des substances chimiques, réduisant ainsi la durée de transmission des signaux chimiques. Ce phénomène a été étudié chez les fourmis *Tapinoma nigerrimum*, montrant ainsi que des températures plus élevées rendaient les phéromones de trace plus volatiles, rendant par conséquent l'accès aux ressources indiquées par ces sentiers odorants plus difficile (van Oudenhove *et al.*, 2011). De plus, le vent et l'humidité peuvent également affecter la vitesse, la direction et la distance de diffusion des signaux chimiques.

Ces modifications de l'environnement peuvent donc nuire à la transmission des signaux en augmentant le bruit environnemental. Les organismes peuvent alors y répondre en ajustant leur type de communication afin de surmonter ce bruit. La communication multimodale permet aux individus de basculer entre différents canaux sensoriels lorsqu'un canal est trop bruyant (« *multimodal shift* » en anglais ; Partan *et al.*, 2010; Partan, 2013). Par exemple, chez les anoues, la communication acoustique utilisée par les mâles lors de leur parade nuptiale peut être masquée par la présence de bruit de fond dans l'environnement. Preininger *et al.* (2013) ont mis en évidence que chez les grenouilles *Micronus saxicola*, le signal acoustique associé à un signal visuel (le sac vocal) améliore la détection et la discrimination des signaux acoustiques parmi le bruit de fond biotique complexe en les rendant plus perceptibles par les autres individus. La communication multimodale permet donc de moduler les différents canaux de communication utilisés par les individus afin de répondre à des modifications de l'environnement qui pourraient perturber la transmission des signaux.

Dans le contexte actuel de changement globaux, il s'avère être primordial d'étudier la manière dont les animaux réagissent à ces perturbations (e.g. le changement climatique et les perturbations anthropiques telles que l'urbanisation ou encore la pollution) en adaptant leur communication. Etant donné que ces changements globaux peuvent affecter les différents canaux de communication et même influencer l'évolution et l'utilisation de la communication multimodale il est nécessaire de réaliser des études sur la communication animale, à la fois en unimodal et en multimodal. Ces études pourront alors nous permettre de mieux prévoir la biodiversité future et de comprendre comment les comportements animaux évoluent.

BIBLIOGRAPHIE

- Albone ES. 1984. *Mammalian Semiochemistry*. New York: John Wiley.
- Albone ES, Gosden PE, Ware GC. 1977. Bacteria as a source of chemical signals in mammals. In: Müller-Schwarze D, Mozell MM, eds. *Chemical Signals in Vertebrates*. New York: Plenum Press, 35–44.
- Allainé D, Brondex F, Graziani L, Coulon J, Till-Bottraud I. 2000. Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behavioral Ecology* 11: 507–514.
- Allainé D, Theuriau F. 2004. Is there an optimal number of helpers in Alpine marmot family groups? *Behavioral Ecology* 15: 916–924.
- Amo L, Avilés JM, Parejo D, Peña A, Rodríguez J, Tomás G. 2012. Sex recognition by odour and variation in the uropygial gland secretion in starlings: odour-based sex recognition in a bird. *Journal of Animal Ecology* 81: 605–613.
- Arakawa H, Arakawa K, Blanchard DC, Blanchard RJ. 2008. A new test paradigm for social recognition evidenced by urinary scent marking behavior in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research* 190: 97–104.
- Archie EA, Theis KR. 2011. Animal behaviour meets microbial ecology. *Animal Behaviour* 82: 425–436.
- Armitage KB. 1981. Sociality as a life-history tactic of ground squirrels. *Oecologia* 48: 36–49.
- Armitage KB. 1999. Evolution of sociality in marmots. *Journal of Mammalogy* 80: 1–10.
- Armitage KB. 2017. Hibernation as a major determinant of life-history traits in marmots. *Journal of Mammalogy* 98: 321–331.
- Ay N, Flack J, Krakauer DC. 2007. Robustness and complexity co-constructed in multimodal signalling networks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362: 441–447.
- Bergman TJ, Beehner JC. 2015. Measuring social complexity. *Animal Behaviour* 103: 203–209.
- Bloss J, Acree TE, Bloss JM, Hood WR, Kunz TH. 2002. Potential use of chemical cues for colony-mate recognition in the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 819–834.
- Blumstein DT, Armitage KB. 1997. Does sociality drive the evolution of communicative complexity? A comparative test with ground-dwelling Sciurid alarm calls. *The American Naturalist* 150: 179–200.
- Blumstein DT, Armitage KB. 1999. Cooperative breeding in marmots. *Oikos* 84: 369–382.
- Boulet M, Charpentier MJ, Drea CM. 2009. Decoding an olfactory mechanism of kin recognition and inbreeding avoidance in a primate. *BMC Evolutionary Biology* 9: 281.
- Brown RE, Macdonald DW. 1985. *Social Odours in Mammals*. Oxford: Clarendon Press.
- Buesching CD, Stopka P, MacDonald DW. 2003. The social function of allo-marking in the European badger (*Meles meles*). *Behaviour* 140: 965–980.

- Buesching CD, Tinnesand HV, Sin Y, Rosell F, Burke T, Macdonald DW. 2016. Coding of group odor in the subcaudal gland secretion of the european badger *Meles meles*: chemical composition and pouch microbiota. *Chemical Signals in Vertebrates* **13**: 45–62.
- Burgener N, Dehnhard M, Hofer H, East ML. 2009. Does anal gland scent signal identity in the spotted hyaena? *Animal Behaviour* **77**: 707–715.
- Burgener N, East ML, Hofer H, Dehnhard M. 2008. Do spotted hyena scent marks code for clan membership? In: Hurst JL, Beynon RJ, Roberts SC, Wyatt TD, eds. *Chemical signals in vertebrates* 11. New York: Springer, 169–177.
- Busquet N, Baudoin C. 2005. Odour similarities as a basis for discriminating degrees of kinship in rodents: evidence from *Mus spicilegus*. *Animal Behaviour* **70**: 997–1002.
- Charpentier MJE, Boulet M, Drea CM. 2008. Smelling right: the scent of male lemurs advertises genetic quality and relatedness. *Molecular Ecology* **17**: 3225–3233.
- Cohas A, Yoccoz NG, Bonenfant C, Goossens B, Genton C, Galan M, Kempenaers B, Allainé D. 2008. The genetic similarity between pair members influences the frequency of extrapair paternity in Alpine marmots. *Animal Behaviour* **76**: 87–95.
- Darwin C. 1872. *The Expression of Emotions in Man and Animals*. London.
- van Dongen WF, White J, Brandl HB, Moodley Y, Merklings T, Leclaire S, Blanchard P, Danchin É, Hatch SA, Wagner RH. 2013. Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BMC Ecology* **13**: 11.
- Drea CM, Vignieri SN, Kim HS, Weldele ML, Glickman SE. 2002. Responses to olfactory stimuli in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*): II. Discrimination of conspecific scent. *Journal of Comparative Psychology* **116**: 342–349.
- Ekblom R, Saether SA, Grahm M, Fiske P, Kålås JA, Höglund J. 2004. Major histocompatibility complex variation and mate choice in a lekking bird, the great snipe (*Gallinago media*). *Molecular Ecology* **13**: 3821–3828.
- Ezenwa VO, Williams AE. 2014. Microbes and animal olfactory communication: Where do we go from here? *BioEssays* **36**: 847–854.
- de Fátima Alpendurada M. 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* **889**: 3–14.
- Ferkin MH, Johnston RE. 1993. Roles of gonadal hormones in control of five sexually attractive odors of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Hormones and Behavior* **27**: 523–538.
- Ferkin MH, Johnston RE. 1995a. Effects of pregnancy, lactation, and post-partum oestrus on odour signals and the attraction to odours in female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Animal Behaviour* **49**: 1211–1217.
- Ferkin MH, Johnston RE. 1995b. Meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, use multiple sources of scent for sex recognition. *Animal Behaviour* **49**: 37–44.

- Ferkin MH, Sorokin ES, Renfroe MW, Johnston RE. 1994. Attractiveness of male odors to females varies directly with plasma testosterone concentration in meadow voles. *Physiology & Behavior* 55: 347–353.
- Fernald RD. 2014. Communication about social status. *Current Opinion in Neurobiology* 28: 1–4.
- Ferrandiz-Rovira M, Allainé D, Callait-Cardinal MP, Cohas A. 2016. Mate choice for neutral and MHC genetic characteristics in Alpine marmots: different targets in different contexts? *Ecology and Evolution* 6: 4243–4257.
- Freeberg TM. 2006. Social complexity can drive vocal complexity: group size influences vocal information in Carolina chickadees. *Psychological Science* 17: 557–561.
- Freeberg TM, Dunbar RIM, Ord TJ. 2012a. Social complexity as a proximate and ultimate factor in communicative complexity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1785–1801.
- Freeberg TM, Ord TJ, Dunbar RIM. 2012b. The social network and communicative complexity: preface to theme issue. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1782–1784.
- Gabirot M, Mardon J, Campagna S, West N, Bonadonna F, Saunders SM. 2016. Guidelines for collecting and extracting avian odors in a remote field: case study of a subantarctic seabird. In: Schulte BA, Goodwin TE, Ferkin MH, eds. *Chemical Signals in Vertebrate* 13. Switzerland: Springer, 435–460.
- García-Roa R, Carreira S, López P, Martín J. 2016. Genders matters: sexual differences in chemical signals of *Liolaemus wiegmanni* lizards (Iguania, Liolaemidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 69: 108–114.
- Gilfillan GD, Vitale JDT, McNutt JW, McComb K. 2017. Spontaneous discrimination of urine odours in wild African lions, *Panthera leo*. *Animal Behaviour* 126: 177–185.
- Gosling LM, McKay HV. 1990. Competitor assessment by scent matching: an experimental test. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 26: 415–420.
- Harris RL, Holland BR, Cameron EZ, Davies NW, Nicol SC. 2014. Chemical signals in the echidna: differences between seasons, sexes, individuals and gland types. *Journal of Zoology* 293: 171–180.
- Hebets EA, Papaj DR. 2005. Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57: 197–214.
- Henkel S, Lambides AR, Berger A, Thomsen R, Widdig A. 2015. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) recognize group membership via olfactory cues alone. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 69: 2019–2034.
- Higham JP, Hebets EA. 2013. An introduction to multimodal communication. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67: 1381–1388.
- Hinz C, Namekawa I, Behrmann-Godel J, Oppelt C, Jaeschke A, Müller A, Friedrich RW, Gerlach G. 2013. Olfactory imprinting is triggered by MHC peptide ligands. *Scientific Reports* 3: 2800.

- Hollén LI, Manser MB. 2007. Motivation before meaning: motivational information encoded in meerkat alarm calls develops earlier than referential information. *169*: 758–767.
- Hurst JL. 2009. Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural Brain Research* 200: 295–303.
- Hurst JL, Beynon RJ. 2010. Making progress in genetic kin recognition among vertebrates. *Journal of Biology* 9: 13.
- James AG, Austin CJ, Cox DS, Taylor D, Calvert R. 2013. Microbiological and biochemical origins of human axillary odour. *FEMS Microbiology Ecology* 83: 527–540.
- Johnston RE. 2003. Chemical communication in rodents: from pheromones to individual recognition. *Journal of Mammalogy* 84: 1141–1162.
- Johnston RE, Derzie A, Chiang G, Jernigan P, Lee HC. 1993. Individual scent signatures in golden hamsters: evidence for specialization of function. *Animal Behaviour* 45: 1061–1070.
- Johnston RE, Robinson TA. 1993. Cross-species discrimination of individual odors by hamsters (Muridae: *Mesocricetus auratus*, *Phodopus campbelli*). *Ethology* 94: 317–325.
- Kappeler PM. 2019. A framework for studying social complexity. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 73: 13.
- Kean EF, Müller CT, Chadwick EA. 2011. Otter scent signals age, sex, and reproductive status. *Chemical Senses* 36: 555–564.
- Knapp LA, Robson J, Waterhouse JS. 2006. Olfactory signals and the MHC: a review and a case study in *Lemur catta*. *American Journal of Primatology* 68: 568–584.
- Krams I, Krama T, Freeberg TM, Kullberg C, Lucas JR. 2012. Linking social complexity and vocal complexity: a parid perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1879–1891.
- Krueger K, Flauger B. 2011. Olfactory recognition of individual competitors by means of faeces in horse (*Equus caballus*). *Animal Cognition* 14: 245–257.
- Kwak J, Willse A, Preti G, Yamazaki K, Beauchamp GK. 2010. In search of the chemical basis for MHC odourtypes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277: 2417–2425.
- Lai SC, Johnston RE. 1994. Individual odors in Djungarian hamsters (*Phodopus campbelli*). *Ethology* 96: 117–126.
- Lai SC, Vasilieva NYu, Johnston RE. 1996. Odors providing sexual information in Djungarian hamsters: evidence for an across-odor code. *Hormones and Behavior* 30: 26–36.
- Lamarck JB de M. 1809. *Phylosophie Zoologique*. Paris: Dentus, 346.
- Lanyon CV, Rushton SP, O'Donnell AG, Goodfellow M, Ward AC, Petrie M, Jensen SP, Morris Gosling L, Penn DJ. 2007. Murine scent mark microbial communities are genetically determined. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 576–583.

- Leclaire S, van Dongen WFD, Voccia S, Merklings T, Ducamp C, Hatch SA, Blanchard P, Danchin É, Wagner RH. 2014a. Preen secretions encode information on MHC similarity in certain sex-dyads in a monogamous seabird. *Scientific Reports* 4: 6920.
- Leclaire S, Merklings T, Raynaud C, Giacinti G, Bessière JM, Hatch SA, Danchin E. 2011. An individual and a sex odor signature in kittiwakes? Study of the semiochemical composition of preen secretion and preen down feathers. *Naturwissenschaften* 98: 615–624.
- Leclaire S, Nielsen JF, Drea CM. 2014b. Bacterial communities in meerkat anal scent secretions vary with host sex, age, and group membership. *Behavioral Ecology* 25: 996–1004.
- Leclaire S, Strandh M, Dell’Ariccia G, Gabirot M, Westerdahl H, Bonadonna F. 2019. Plumage microbiota covaries with the major histocompatibility complex in blue petrels. *Molecular Ecology* 28: 833–846.
- Leclaire S, Strandh M, Mardon J, Westerdahl H, Bonadonna F. 2017. Odour-based discrimination of similarity at the major histocompatibility complex in birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284: 20162466.
- Linklater WL, Mayer K, Swaisgood RR. 2013. Chemical signals of age, sex and identity in black rhinoceros. *Animal Behaviour* 85: 671–677.
- Linklater WL, Swaisgood RR. 2008. Reserve size, conspecific density, and translocation success for black rhinoceros. *Journal of Wildlife Management* 72: 1059–1068.
- Liu D, Wei R, Zhang G, Yuan H, Wang Z, Sun L, Zhang J, Zhang H. 2008. Male panda (*Ailuropoda melanoleuca*) urine contains kinship information. *Science Bulletin* 53: 2793–2800.
- Luque-Larena JJ, López P, Gosálbez J. 2001. Scent matching modulates space use and agonistic behaviour between male snow voles, *Chionomys nivalis*. *Animal Behaviour* 62: 1089–1095.
- MacDonald EA, Fernandez-duque E, Evans S, Hagey LR. 2008. Sex, age, and family differences in the chemical composition of owl monkey (*Aotus nancymae*) subcaudal scent secretions. *American Journal of Primatology* 70: 12–18.
- Manser MB. 2001. The acoustic structure of suricates’ alarm calls varies with predator type and the level of response urgency. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 268: 2315–2324.
- Manser MB, Seyfarth RM, Cheney DL. 2002. Suricate alarm calls signal predator class and urgency. *TRENDS in Cognitive Sciences* 6: 55–57.
- Marler P. 1977. The evolution of communication. In: Sebeok TA, eds. *How animals communicate*. Bloomington: University Press, 45–70.
- Mateo JM. 2003. Kin recognition in ground squirrels and other rodents. *Journal of Mammalogy* 84: 1163–1181.
- Michener GR. 1983. Kin identification, matriarchies, and the evolution of sociality in ground-dwelling sciurids. *Advances in the study of mammalian behavior* 7: 528–572.

- Milinski M, Croy I, Hummel T, Boehm T. 2013. Major histocompatibility complex peptide ligands as olfactory cues in human body odour assessment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20122889.
- Morelli TL, Hayes RA, Nahrung HF, Goodwin TE, Harelimana IH, MacDonald LJ, Wright PC. 2013. Relatedness communicated in lemur scent. *Naturwissenschaften* 100: 769–777.
- Müller-Schwarze D. 1971. Pheromones in black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Animal Behaviour* 19: 141–152.
- Olsson M, Madsen T, Nordby J, Wapstra E, Ujvari B, Wittsell H. 2003. Major histocompatibility complex and mate choice in sand lizards. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270: S254–S256.
- Ord TJ, Garcia-Porta J. 2012. Is sociality required for the evolution of communicative complexity? Evidence weighed against alternative hypotheses in diverse taxonomic groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1811–1828.
- van Oudenhove L, Billoir E, Boulay R, Bernstein C, Cerdá X. 2011. Temperature limits trail following behaviour through pheromone decay in ants. *Naturwissenschaften* 98: 1009–1017.
- Partan SR. 2013. Ten unanswered questions in multimodal communication. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67: 1523–1539.
- Partan SR, Fulmer AG, Gounard MAM, Redmond JE. 2010. Multimodal alarm behavior in urban and rural gray squirrels studied by means of observation and a mechanical robot. *Current Zoology* 56: 313–326.
- Partan SR, Marler P. 2005. Issues in the classification of multimodal communication signals. *The American Naturalist* 166: 231–245.
- Pearce DS, Hoover BA, Jennings S, Nevitt GA, Docherty KM. 2017. Morphological and genetic factors shape the microbiome of a seabird species (*Oceanodroma leucorhoa*) more than environmental and social factors. *Microbiome* 5: 146.
- Peckre L, Kappeler PM, Fichtel C. 2019. Clarifying and expanding the social complexity hypothesis for communicative complexity. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 73: 11.
- Penn DJ. 2002. The scent of genetic compatibility: sexual selection and the Major Histocompatibility Complex. *Ethology* 108: 1–21.
- Penn DJ, Potts WK. 1998. How do major histocompatibility genes influence odor and mating preferences? *Advances in Immunology* 69: 411–435.
- Pollard KA, Blumstein DT. 2011. Social group size predicts the evolution of individuality. *Current Biology* 21: 413–417.
- Pollard KA, Blumstein DT. 2012. Evolving communicative complexity: insights from rodents and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1869–1878.

- Potier S, Besnard MM, Schikorski D, Buatois B, Duriez O, Gabirot M, Leclaire S, Bonadonna F. 2018. Preen oil chemical composition encodes individuality, seasonal variation and kinship in black kites *Milvus migrans*. *Journal of Avian Biology* 49: e01728.
- Preininger D, Boeckle M, Freudmann A, Starnberger I, Sztatecsny M, Hödl W. 2013. Multimodal signaling in the small torrent frog (*Micrixalus saxicola*) in a complex acoustic environment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67: 1449–1456.
- Radwan J, Tkacz A, Kloch A. 2008. MHC and preferences for male odour in the bank vole. *Ethology* 114: 827–833.
- Restrepo D, Lin W, Salcedo E, Yamazaki K, Beauchamp G. 2006. Odortypes and MHC peptides: complementary chemosignals of MHC haplotype? *TRENDS in Neurosciences* 29: 604–609.
- Rézouki C. 2018. Ph.D. Thesis. The influence of lifestyle on demographic responses to climate change: the Alpine marmot as a case study.
- Rosell F, Jojola SM, Ingdal K, Lassen BA, Swenson JE, Arnemo JM, Zedrosser A. 2011. Brown bears possess anal sacs and secretions may code for sex. *Journal of Zoology* 283: 143–152.
- Rowe C, Guilford T. 1996. Hidden colour aversions in domestic chicks triggered by pyrazine odours of insect warning displays. *Nature* 383: 520–522.
- Rubenstein DI, Hack MA. 1992. Horse signals: the sounds and scents of fury. *Evolutionary Ecology* 6: 254–260.
- Safi K, Kerth G. 2003. Secretions of the interaural gland contain information about individuality and colony membership in the Bechstein's bat. *Animal Behaviour* 65: 363–369.
- Schellinck HM, Brown RE, Slotnick BM. 1991. Training rats to discriminate between the odors of individual conspecifics. *Animal Learning & Behavior* 19: 223–233.
- Schulz S, Dickschat JS. 2007. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports* 24: 814–842.
- Scordato ES, Dubay G, Drea CM. 2007. Chemical composition of scent marks in the ringtailed lemur (*Lemur catta*): glandular differences, seasonal variation, and individual signatures. *Chemical Senses* 32: 493–504.
- Setchell JM, Charpentier MJE, Abbott KM, Wickings EJ, Knapp LA. 2010a. Opposites attract: MHC-associated mate choice in a polygynous primate. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 136–148.
- Setchell JM, Vaglio S, Abbott KM, Moggi-Cecchi J, Boscaro F, Pieraccini G, Knapp LA. 2011. Odour signals major histocompatibility complex genotype in an Old World monkey. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 274–280.
- Setchell JM, Vaglio S, Moggi-Cecchi J, Boscaro F, Calamai L, Knapp LA. 2010b. Chemical composition of scent-gland secretions in an old world monkey (*Mandrillus*

- sphinx*): influence of sex, male status, and individual identity. *Chemical Senses* **35**: 205–220.
- Sin YW, Annavi G, Newman C, Buesching C, Burke T, Macdonald DW, Dugdale HL. 2015. MHC class II-assortative mate choice in European badgers (*Meles meles*). *Molecular Ecology* **24**: 3138–3150.
- Singh PB, Herbert J, Roser B, Arnott L, Tucker DK, Brown RE. 1990. Rearing rats in a germ-free environment eliminates their odors of individuality. *Journal of Chemical Ecology* **16**: 1667–1682.
- Slade JW, Watson MJ, Kelly TR, Gloor GB, Bernard MA, MacDougall-Shackleton EA. 2016. Chemical composition of preen wax reflects major histocompatibility complex similarity in songbirds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**: 20161966.
- Slobodchikoff CN, Paseka A, Verdolin JL. 2009. Prairie dog alarm calls encode labels about predator colors. *Animal Cognition* **12**: 435–439.
- Spence-Aizenberg A, Kimball BA, Williams LE, Fernandez-Duque E. 2018. Chemical composition of glandular secretions from a pair-living monogamous primate: sex, age, and gland differences in captive and wild owl monkeys (*Aotus spp.*). *American Journal of Primatology* **80**: e22730.
- Stafstrom JA, Hebets EA. 2013. Female mate choice for multimodal courtship and the importance of the signaling background for selection on male ornamentation. *Current Zoology* **59**: 200–209.
- Stoffel MA, Caspers BA, Forcada J, Giannakara A, Baier M, Eberhart-Phillips L, Müller C, Hoffman JL. 2015. Chemical fingerprints encode mother–offspring similarity, colony membership, relatedness, and genetic quality in fur seals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: E5005–E5012.
- Strandh M, Westerdahl H, Pontarp M, Canback B, Dubois MP, Miquel C, Taberlet P, Bonadonna F. 2012. Major Histocompatibility Complex class II compatibility, but not class I, predicts mate choice in a bird with highly developed olfaction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 4457–4463.
- Sun L, Müller-Schwarze D. 1998a. Anal gland secretion codes for relatedness in the Beaver, *Castor canadensis*. *Ethology* **104**: 917–927.
- Sun L, Müller-Schwarze D. 1998b. Anal gland secretion codes for family membership in the beaver. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **44**: 199–208.
- Theis KR, Heckla AL, Verge JR, Holekamp KE. 2008. The ontogeny of pasting behavior in free-living spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. In: Hurst JL, Beynon RJ, Roberts SC, Wyatt TD, eds. *Chemical signals in vertebrates 11*. New York: Springer, 179–187.
- Theis KR, Schmidt TM, Holekamp KE. 2012. Evidence for a bacterial mechanism for group-specific social odors among hyenas. *Scientific Reports* **2**: 615.

- Theis KR, Venkataraman A, Dycus JA, Koonter KD, Schmitt-Matzen EN, Wagner AP, Holekamp KE, Schmidt TM. 2013. Symbiotic bacteria appear to mediate hyena social odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 19832–19837.
- Tinnesand HV, Jojola S, Zedrosser A, Rosell F. 2013. The smell of desperadoes? Beavers distinguish between dominant and subordinate intruders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **67**: 895–904.
- Vaglio S, Minicozzi P, Romoli R, Boscaro F, Pieraccini G, Moneti G, Moggi-Cecchi J. 2016. Sternal gland scent-marking signals sex, age, rank, and group identity in captive mandrills. *Chemical Senses* **41**: 177–186.
- Voigt CC, Caspers B, Speck S. 2005. Bats, bacteria, and bat smell: sex-specific diversity of microbes in a sexually selected scent organ. *Journal of Mammalogy* **86**: 745–749.
- Wedekind C, Seebeck T, Bettens F, Paepke AJ. 1995. MHC-dependant mate preferences in humans. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **260**: 245–249.
- White J, Mirleau P, Danchin E, Mulard H, Hatch SA, Heeb P, Wagner RH. 2010. Sexually transmitted bacteria affect female cloacal assemblages in a wild bird: sexually transmitted bacteria in kittiwakes. *Ecology Letters* **13**: 1515–1524.
- Whittaker DJ, Soini HA, Atwell JW, Hollars C, Novotny MV, Ketterson ED. 2010. Songbird chemosignals: volatile compounds in preen gland secretions vary among individuals, sexes, and populations. *Behavioral Ecology* **21**: 608–614.
- Wilgers DJ, Hebets EA. 2011. Complex courtship displays facilitate male reproductive success and plasticity in signaling across variable environments. *Current Zoology* **57**: 175–186.
- Wolff JO. 2003. Laboratory studies with rodents: facts or artifacts? *BioScience* **53**: 421–427.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Imai Y, Bard J, Phelan SP, Thomas L, Boyse EA. 1990. Odor types determined by the major histocompatibility complex in germfree mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**: 8413–8416.
- Zhang YH, Zhang JX. 2011. Urine-derived key volatiles may signal genetic relatedness in male rats. *Chemical Senses* **36**: 125–135.
- Zidat T, Dufour AB, Meiffren G, Gabirot M, Comte G, Allainé D. 2018. Anal scent gland secretions inform on sexual maturity, sex and social status in the Alpine marmot, *Marmota marmota* (Rodentia: Sciuridae): a role in intrasexual competition in cooperative breeders? *Biological Journal of the Linnean Society* **125**: 229–239.

ANNEXE I

Reproductive isolation maintains distinct genotypes, phenotypes and chemical signatures in mixed colonies of the two European *Calonectris* shearwaters (Procellariiformes: Procellariidae)

TIMOTHEE ZIDAT^{1,2*}, GAIA DELL'ARICCIA^{1,3}, MARIANNE GABIROT⁴,
PATRICIA SOURROUILLE¹, BRUNO BUATOIS¹, AURELIE CELERIER¹,
FRANCESCO BONADONNA¹ and PIERRE-ANDRE CROCHET¹

¹CEFE UMR 5175, CNRS – Université de Montpellier – Université Paul-Valéry Montpellier – EPHE, 1919 route de Mende, F-34293 Montpellier, Cedex 5, France

²LBBE UMR 5558, CNRS – Université de Lyon – Université Claude Bernard Lyon 1 – 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne, Cedex, France

³Biodiversity Research Institute (IRBio) and Department of Animal Biology, University of Barcelona, avenida Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

⁴Organisms and Environment Research Division, Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff CF10 3AX, UK

Received 17 August 2016; revised 8 December 2016; accepted for publication 7 January 2017

Reproductive isolation of avian species often extensively relies on mate choice. Several bird species have recently been shown to use chemical cues in mate choice, in addition to the well-studied visual and acoustic signals. The two former European subspecies of Cory's shearwater have been recently afforded species status as *Calonectris borealis* and *C. diomedea*, but their level of reproductive isolation has not fully been evaluated and one previous study suggested that their nuclear genome is undifferentiated. The species differ in chemical labels (volatile compounds in uropygial gland secretions) in allopatry, but whether these differences are maintained in sympatry or not remains unclear. We sampled both species in a mixed colony in the Chafarinas Islands in order to test whether their nuclear genomes are truly undifferentiated and to study their level of reproductive isolation in sympatry. We also tested whether the chemical differences in uropygial secretions observed in allopatric populations are maintained in sympatry or not. We established a clear divergence in nuclear genome between these species, suggesting efficient reproductive isolation mechanisms, and found evidence for assortative mating. We also found that chemical labels remain distinct in sympatry, suggesting their divergence is not purely due to environmental effects.

ADDITIONAL KEYWORDS: assortative mating – hybridization – introgression – mate choice – odour cues – Procellariiform seabirds – species recognition – sympatry – uropygial secretion.

INTRODUCTION

Speciation requires the evolution of efficient mechanisms of pre- or post-mating reproductive isolation. In animals, pre-mating isolation often relies on species-recognition systems which determine mate choice and are essential to maintain species boundaries (Panhuis *et al.*, 2001). Species recognition and mate choice are

based on phenotypic cues such as morphology, acoustics, odours or behaviour and often rely on several cues at a time to increase their efficiency (Candolin, 2003). In many bird species, for example, courtship displays that form the basis of mate choice associate acoustic and visual cues (Price, 2008). While the role of acoustic and visual cues in avian mate choice and pre-mating isolation is well established (Baker & Baker, 1990; Grant & Grant, 1997; Price, 2008), chemical communication has long been neglected in birds,

*Corresponding author. E-mail: timothee.zidat@univ-lyon1.fr

although it is common in other groups of vertebrates (Taga & Bassler, 2003; Fatouros *et al.*, 2005; Smadja & Butlin, 2009; Martín & López, 2014).

Birds appear to employ olfactory cues in individual recognition and mate choice more widely than previously thought. In birds, many chemical substances are produced by the uropygial gland located at the dorsal base of the tail (Jacob & Ziswiler, 1982). These chemical substances establish a bird's 'personal odour' (Bonadonna *et al.*, 2007; Karlsson *et al.*, 2010; Mardon *et al.*, 2010; Mardon, Saunders & Bonadonna, 2011; Leclaire *et al.*, 2011), allowing individual recognition and kin recognition (Bonadonna & Nevitt, 2004; Mardon & Bonadonna, 2009; Coffin, Watters & Mateo, 2011; Bonadonna & Sanz-Aguilar, 2012), and they influence social interactions, including mate choice, in several species (Amo *et al.*, 2012; Bonadonna & Mardon, 2013; Caro, Balthazart & Bonadonna, 2015; Krause *et al.*, 2014; Wyatt, 2014). In addition, the abundance and diversity of these olfactory substances vary between populations (Whittaker *et al.*, 2010), species (Bonadonna & Mardon, 2010; Soini *et al.*, 2013; Zhang, Du & Zhang, 2013; Gabirot *et al.*, 2016), sexes (Mardon *et al.*, 2010; Whittaker *et al.*, 2010; Leclaire *et al.*, 2011) and with relatedness among conspecifics (Leclaire *et al.*, 2012).

Seabirds of the order Procellariiformes (albatrosses, shearwaters and petrels) are one of the best models to explore olfactory species recognition and mate choice in birds because they have a highly developed olfactory system (Cobb, 1968) and use smell in a number of different behaviours, including food finding, nest recognition, homing and individual recognition (Bonadonna & Nevitt, 2004; Bonadonna & Mardon, 2010; Mardon *et al.*, 2010; Gagliardo *et al.*, 2013; Dell'Ariccia *et al.*, 2014). Many of the smaller species of Procellariiformes share very similar plumage and size, and are nocturnal at the colony, making it unlikely that visual cues play a significant role in species-recognition (Brooke, 1989; Martin & Brooke, 1991; Mougin, 2000; Bried *et al.*, 2010; Nava *et al.*, 2014). Most of these species differ in vocalization, but play-back experiments suggest that species-recognition based on acoustics alone is incomplete (Mougeot & Bretagnolle, 2000). Bonadonna & Mardon (2010) showed that blue petrels *Halobaena caerulea* (Gmelin, 1789) can discriminate between odours of conspecifics and odours of the sympatrically breeding Antarctic prions *Pachyptila desolata* (Gmelin, 1789), preferring their own species. Petrels' sense of smell may thus play a role in pre-mating barriers, opening up the possibility of a 'speciation by smell' mediated by a divergence in the uropygial secretions' composition (Bonadonna & Mardon, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Gabirot *et al.*, 2016).

Among Procellariiformes, Cory's *Calonectris borealis* (Cory, 1881) and Scopoli's *C. diomedea* (Scopoli,

1769) shearwater have long been regarded as conspecific, but they have been recently elevated to species rank (Sangster *et al.*, 2012; Gill & Donsker, 2014; BirdLife International, 2015). They are very similar but, despite their geographical proximity, they differ slightly in size (*C. borealis* being larger, Granadeiro, 1993), and have distinctly different mating calls (Bretagnolle & Lequette, 1990) and diagnostic mitochondrial haplotypes (Gómez-Díaz *et al.*, 2006; Gómez-Díaz, González-Solís & Peinado, 2009); minor plumage differences also exist (Gutierrez, 1998). During the breeding season, they have a mostly allopatric range (Atlantic for *C. borealis*, Mediterranean for *C. diomedea*), but are locally sympatric in the westernmost Mediterranean Basin, where at least one *C. borealis* colony and one mixed colony are known (Gómez-Díaz *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2009). In spite of this, no empirical evaluation of their level of reproductive isolation has been performed so far to test their biological species status. In addition, Genovart *et al.* (2013) suggested that no nuclear differentiation exists between the two species as they found no divergence in microsatellite markers. This result is surprising given the fact that many of the differences outlined above certainly have a genetic basis, and is partly contradicted by Munilla *et al.* (2016) who identified two main genetic clusters on microsatellite genotypes, corresponding to the Atlantic and Mediterranean taxa, but with incomplete separation between the two. In addition, Gabirot *et al.* (2016) showed a different composition in uropygial gland secretions between *C. borealis* sampled in the Atlantic Ocean and *C. diomedea* sampled in the Mediterranean Sea. However, their study could not ascertain whether this divergence in chemical labels was due to environmental factors (e.g. different diet or nesting areas) or to genetics.

For the present study, we sampled uropygial gland secretion, DNA and morphometric measures in *C. borealis* and *C. diomedea* in the only known colony where the two species nest in sympatry, the Chafarinas Islands. We included individuals breeding in two allopatric colonies for comparison. Our objectives were (1) to establish a diagnostic nuclear genetic signature of the Atlantic and Mediterranean taxa, using more microsatellite loci (13 loci) than Genovart *et al.* (2013, 6 loci) and Munilla *et al.* (2016, 10 loci). If we found genetic differences between these species, we would use their distinct genetic background to (2) study their level of reproductive isolation in sympatry and directly assess their species status. Finally, (3) we aimed to test whether the differences in composition of uropygial gland secretions observed in allopatric populations are maintained in sympatry, suggesting a genetic basis for odour specific differences previously reported from allopatric populations.

MATERIAL AND METHODS

STUDY SPECIES AND SAMPLING

We collected blood samples, uropygial gland secretions and seven morphometric measures: beak length (method 1 and 2), maximum beak depth, beak depth at nostril and at gonys (see Fig. 1 for an illustration of beak measures), tarsus length and wing length, from adult Cory's shearwater (*C. borealis*) in the colony on Selvagem Grande (Salvage Islands, Portugal: 30°09'N, 15°52'W, June/July 2012) and Scopoli's shearwater (*C. diomedea*) on Linosa Island (Italy: 35°52'N, 12°52'E, June/July 2011). We sampled both species on the Chafarinas Islands (Spain: 35°11'N, 2°25'W, June 2013) where they breed in sympatry. The same experimenter (GDA) took all biometric measurements in the three colonies. Numbers of sampled individuals for each species are summarized in Table 1. All data are available on request from the corresponding author.

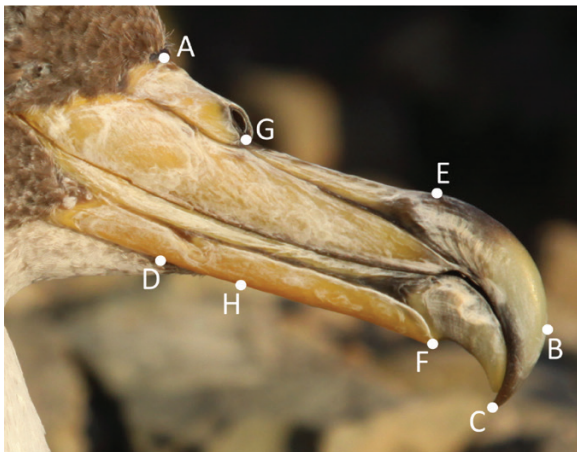


Figure 1. Landmarks used for beak measurements. (A–B): beak length (method 1); (A–C): beak length (method 2); (A–D): maximum beak depth; (E–F): beak depth at gonys; (G–H): beak depth at nostrils.

GENETIC ANALYSES

We extracted DNA from blood with the DNeasy Blood and Tissue kit following the manufacturer's recommended procedures (Qiagen) and we genetically sexed the sampled individuals using the method of Fridolfsson & Ellegren (1999). Every time we detected a discordance between mtDNA haplotype and microsatellite genotype, or between genetics and morphometric identification (see below), the DNA from the corresponding individual was re-extracted and the genotyping repeated on the new extraction to remove the risk of contamination or sample swapping in the lab.

Microsatellite genotyping

We used a set of 13 microsatellite loci, eight of them specifically developed for *C. diomedea* by Bried *et al.* (2008) and five developed for *Puffinus yelkouan* by Gonzalez *et al.* (2009). Amplifications were performed in six multiplex sets and are presented in Supporting Information (Table S1). We amplified DNA fragments in a total volume of 10 µL with 0.2 µM of each primer, 5 µL of QIAGEN multiplex PCR kit and 1 µL of DNA solution. We ran PCRs on a Mastercycler EPgradientS Eppendorf under the following thermocycling conditions: one activation step at 95 °C for 15 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C, 58 °C or 60 °C for 90 s, elongation at 72 °C for 60 s and a final extension at 60 °C for 30 min (adapted from Bried *et al.*, 2008). Specific annealing temperatures for each multiplex set are provided in Supporting Information (Table S1). We checked the amplification results by loading 4 µL of product in a 3% agarose gel and adjusted the dilution of the PCR products for sequencing based on visual evaluation of PCR product concentration on the gel. We added 1–2 µL of the diluted PCR products (1/30 to 1/300) to 15 µL of deionized formamide and 0.2 µL GeneScan-500 LIZ size standard (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). PCR products were separated with a 24-capillary ABI3500xL Genetic Analyser

Table 1. Number of individuals sampled from each colony by species and sex for morphometric measurements, blood and uropygial secretion samples

Breeding colony	Selvagem		Chafarinas				Linosa	
Year sampled	2012		2013				2011	
Species	<i>C. borealis</i>		<i>C. borealis</i>		<i>C. diomedea</i>		<i>C. diomedea</i>	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Morphometry	7	5	5	7	17	10	15	21
Blood	28	14	5	7	17	10	20	22
Uropygial secretion	8	8	5	7	17	10	6	6

(Applied Biosystems) in the Labex CEMEB facilities (Montpellier, France) using POP-7 polymer and the manufacturer's default electrophoresis run settings. Finally, data analysis and genotyping were performed with GeneMapper software (Applied Biosystems).

For each locus and population, we used MICRO-CHECKER v2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2006) to detect null alleles. Linkage disequilibrium among all pairs of loci was tested with GENETIX v4.05 (Belkhir *et al.*, 1996) by permutation tests based on 1000 permutations, for the two pure populations only. We also computed the expected and observed heterozygosity, the deviation from Hardy–Weinberg (HW) equilibrium estimated as Wright's inbreeding coefficient (F_{IS} , whose significance was tested by mean of 1000 permutations) with GENETIX. For all these analyses, Chafarinas' samples were separated into two populations on the basis of the assignation obtained from the factorial correspondence analysis (FCA, see below) as mixing the two species in one single population would create deviation from HW equilibrium because they do not mate at random (see below).

Mitochondrial DNA sequencing

We amplified a 358 bp fragment of domain I of the mitochondrial control region using the primers CAL1L (5'-GGTCCTGAAGCTAGTAATAC-3') and CAL4H (5'-CATCCCATCCAACCTTAAG-3') and the protocol of Gómez-Díaz *et al.* (2006). The PCR products of all sympatric individuals and 18 birds of each allopatric population were sequenced by Eurofins MWG Operon sequencing services (Ebersberg, Germany). We aligned the sequences using CodonCode Aligner v4.2.7 software.

DIFFERENTIATION

We tested for genetic differentiation between populations by computing pairwise F_{ST} values (as θ , Weir & Cockerham, 1984) and their significance using GENETIX; significance was assessed by 1000 permutations of the individuals among populations. Based on microsatellite data only, we visualized the patterns of differentiation by FCA on individual multilocus genotypes as computed by GENETIX. We constructed a phylogenetic tree of mtDNA haplotypes by maximum likelihood with MEGA v.6 (Tamura *et al.*, 2013) using pairwise deletion and default options for the substitution model.

We performed assignation analyses using the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE v2.3 (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000). The results were computed from 1×10^6 iterations after 1×10^5 steps of burn-in. We conducted 10 independent replicates of the Markov chain Monte

Carlo for a number of populations varying from $K = 1$ to $K = 5$. We applied the Evanno method (Evanno, Regnaut & Goudet, 2005) to select the appropriate K -value using the web-based program STRUCTURE HARVESTER v0.6.92 (Earl & von Holdt, 2012). Results were averaged across runs using CLUMPP v1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007). To estimate introgression between the two species in sympatry, we set $K = 2$ and tested for difference in the mean assignment probability to the two species (q , calculated from the mean of the 10 runs) between allopatric and sympatric populations through a Kruskal–Wallis analysis performed in R 3.2.1 (R Core Team, 2015).

DETECTION OF RECENT HYBRIDIZATION

We tested whether first-generation hybrids were present in the Chafarinas Islands by using NEWHYBRIDS v1.1 (Anderson & Thompson, 2002) with 250 000 sweeps along the Markov chain after a burn-in of 10^4 iterations. All Selvagem and Linosa individuals were included as pure species 1 and pure species 2, respectively, and we estimated the posterior probability (PP) for each Chafarinas individual to belong to one of the following classes: pure species 1, pure species 2 or F1 hybrid. To test the power of NEWHYBRIDS to identify hybrids, given the level of differentiation we found between the two species, we simulated 100 virtual F1 hybrids using HYBRIDLAB v1.0 (Nielsen, Bach & Kotlicki, 2006) and analysed them with NEWHYBRIDS using the same options as previously. Because of the low divergence between the species and based on the results of HYBRIDLAB, we did not attempt to identify backcrosses.

BIOMETRIC ANALYSIS

We performed a principal component analysis (PCA) to assess the level of variation in morphometry between and within the two species. Because of sexual size dimorphism in these species, we analysed males and females separately. In the PCA, we included the following measures: maximum beak depth, tarsus length and wing length. Beak length (method 1 and 2), beak depth at nostril and at gonys were not included in the PCA because they were not collected in all colonies. The PCA was performed in R 3.2.1 with the ade4 and rgl packages (R Core Team, 2015).

CHEMICAL ANALYSIS

Sampling procedure

We collected preen gland contents by gently squeezing the area around the gland by hand using clean

nitrile gloves, until a small amount of waxy secretion was discharged (see details in [Mardon *et al.*, 2010](#)). The secretion was then taken with a 100 μ L glass capillary (Hirschmann). The end of the capillary containing the substance was placed into a small opaque empty chromatographic vial (Sigma-Aldrich) closed, sealed with a Teflon faced septum and stored at -20°C in the field and laboratory until extraction.

Sample preparation and extraction

To extract and analyse the volatile compounds, we used the protocol established by [Gabirot *et al.* \(2016\)](#). Briefly, we added 1 mL of a 1:3 mixture of dichloromethane (distilled HPLC grade, $\geq 99.9\%$) and n-hexane (distilled AR grade, $\geq 99.0\%$). The mixture of solvent and uropygial secretion was filtered through a Pasteur pipette filled with a glass wool plug to remove out impurities (dust, feather debris) and concentrated by passing a stream of nitrogen gas to maximize the detection of molecules and/or peak area. We added 5 μ L of an internal standard: a solution of biphenyl (MW = 154.21 g/mol, 99.5%) in a 1:3 mixture of dichloromethane–n-hexane at 0.1 mg/mL. We also prepared blank samples (i.e. controls), which we ran every 10 samples within our samples, containing only solvent and internal standard, with the same protocol of preparation and extraction as for samples containing secretion. Controls served to account for potential noise from the sampling procedure, the extraction protocol and the instrument drift over time. All samples were analysed using the GCMS method as detailed in [Gabirot *et al.* \(2016\)](#).

Chromatographic data processing

Tentative identification of all analytes of interest was performed by cross-checking the best matches obtained from the NIST Mass Spectral Search Program v2.0 (Faircom Corp) and Wiley Registry of Mass Spectral Data, with the calculated retention index (RI) of the analytes. Calculated RIs were obtained by calibrating the GCMS Solution software with the retention times of various linear alkanes from C_8 to C_{26} ($n = 19$), run under identical gas chromatographic conditions. We used a mixture of C_8 – C_{20} alkanes from the standard solution Fluka Analytical (Sigma Aldrich) and of C_{16} – C_{44} alkanes from the ASTM D5442 C16–C44 Qualitative Retention Time Mix (Supelco). For quantitative analyses, standardization across the peak areas of the internal standard (biphenyl, RT = 26.70 min, RI = 1385) was used to account for variations in the GC-MS instrument response (see below). Note that there is no way to be absolutely sure of the identification without comparing their fragmentation patterns

and retention time with those of authentic standards (synthetic commercial compounds), which is impossible when we have a lot of chemicals some of which are not even available for purchase and would need to be synthesized.

Data pre-treatment, resemblance measure and ordination

We retained 17 volatile components whose tentative identification was obtained using the procedure described earlier ([Table 2](#)). These main analytes displayed the largest peak areas (on average) in the chromatogram profiles in at least one population or species, between the range of decane (RT = 14.01 min, RI = 1000) to methyl-pentacosane (RT = 48.67 min, RI = 2552) and were approved after checking for any redundancy and/or poor separation quality and exogenous components (e.g. pollution such as benzene derivatives). Each of these target compounds was then researched and quantified in each sample chromatogram resulting in an output table containing the areas of the peak for all 17 components for each individual sample.

We standardized peak areas for each analyte twice (see [Mardon *et al.*, 2010](#)). The first standardization was carried out with the internal standard (biphenyl, RT = 26.34, RI = 1367) to remove the variation in the instrument response between samples; the second using one of the highest peaks in all samples (methyl-pentacosane, RT = 48.36, RI = 2552) to account for the total amount of secretion, which varied among samples. Standardized data were then square root transformed to reduce the influence of the most abundant analytes on the analysis ([Clarke & Warwick, 2001](#)). We calculated Euclidean distances between every pair of samples to produce a resemblance matrix. We performed a principal coordinates analysis (PCO) based on the Euclidean resemblance matrix ([Gower, 1966](#)) to visualize the patterns of differences in the multivariate chemical structure among samples (see [Mardon *et al.*, 2010](#)). We carried out all statistical analyses using the computer program PRIMER V6.1.12 ([Clarke & Gorley, 2006](#)) supplemented by the PERMANOVA+ V1.0.2 package ([Anderson, Gorley & Clarke, 2008](#)).

Volatile compound comparisons

We first investigated the variation of compound profiles from all populations corresponding to Linosa, Selvagem, Chafarinas *C. diomedea* and Chafarinas *C. borealis*. We initially visualized all data in an unconstrained PCO analysis. We then compared the volatile component profiles from the four populations with a two-factor PERMANOVA (location

Table 2. Main analytes associated with species chemical labels

Retention time (min)	RI calculated	Reference <i>m/z</i> ions	Molecular weight (g/mol)	Name of compound proposed	Formula	<i>r</i> 1	<i>r</i> 2	<i>r</i> 3
21.2	1201	57; 43/65; 71/50; 85/30	170	Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	0.12	0.63	
24.185	1302	57; 43/65; 71/60; 85/35	184	Tridecane	C ₁₃ H ₂₈	0.09	0.73	
34.27	1750	87; 55/40; 43/35; 74/35; 97/15	228	4-Methyl tridecanoate	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.20	0.83	
35.95	1840	55; 83/95; 43/90; 69/85; 97/80	242	Hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	-0.72	-0.01	-0.56
37.555	1930	74; 87/60; 55/35; 43/30; 143/15	270	Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-0.28	0.58	-0.51
37.725	1940	83; 43/95; 55/90; 69/85; 97/80; 111/40	256	Heptadecanol	C ₁₇ H ₃₆ O	-0.01	0.59	-0.48
38.735	1998	43; 55/70; 69/60; 88/50; 97/45; 111/30	282	Eicosene	C ₂₀ H ₄₀	-0.53	-0.04	-0.39
39.44	2039	43; 55; 69/75; 83/70; 97/60; 111/35	270	Octadecanol	C ₁₈ H ₃₈ O	-0.86	-0.32	-0.77
40.905	2124	74; 87/80; 43/50; 55/35; 143/20	298	Methyl octadecanoate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	-0.16	0.75	-0.19
41.09	2135	55; 83/90; 97/85; 43/85; 69/75	284	Nonadecanol	C ₁₉ H ₄₀ O	-0.57	0.13	-0.64
41.99	2187	88; 43/70; 55/65; 101/60; 69/40	312	Ethyl octadecanoate	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	-0.01	-0.41	-0.07
42.66	2226	55; 43/90; 83/75; 69/65; 97/60	308	Docosene	C ₂₂ H ₄₄	-0.93	-0.23	-0.91
44.175	2314	55; 43/95; 83/75; 69/70; 97/65; 111/35	298	Eicosanol	C ₂₀ H ₄₂ O	-0.71	-0.02	-0.79
45.025	1364	43; 55/90; 69/70; 83/65; 97/60	-	Non-identified	-	-0.28	0.36	-0.42
45.68	2402	97; 83/90; 57/90; 69/75; 43/70; 111/60; 125/30	336	Tetracosene	C ₂₄ H ₄₈	-0.74	-0.33	-0.61
46.37	2442	57; 43/75; 69/45; 97/45; 83/40; 111/30	326	Docosanol	C ₂₂ H ₄₆ O	0.12	-0.34	-0.33
47.06	2482	97; 57/90; 83/90; 43/80; 69/70; 111/60; 125/35	-	Non-identified	-	-0.33	-0.08	-0.49

Note: *r* corresponds to the Pearson correlation of a particular compound with the CAP axis discriminating the two species (*r*1 and *r*3 in sympatry) or three colonies (Chafarinas, Linosa and Selvagem islands, *r*2). Strong contributions are in bold. For information, critical *r* values (at a level of $\alpha = 5\%$) would be respectively |0.43| (species), |0.30| (colonies) and |0.55| (species sympatry).

and species effects) (Anderson, 2001; McArdle & Anderson, 2001) with 9999 permutations (see Mardon *et al.*, 2010). We then compared the volatile compound profiles between location within species and between species, then specifically between *C. diomedea* and *C. borealis* in sympatry, that is from Chafarinas.

Finally, we examined significant differences between species and between species in sympatry (i.e. in Chafarinas Islands), using a canonical analysis of principal coordinates (CAP, Anderson & Willis, 2003), which is useful for obtaining predictive models that search the multivariate data for the best discrimination between groups defined prior to the analysis. The number of PCO axes that we use in the CAP modelling and the predictive capability of the model to discriminate these species and locations were assessed using a leave-one-out cross-validation method (Anderson & Robinson, 2003).

Identification of analytes associated with the different labels

We examined the CAP model that best discriminated the two species to identify the analytes associated with the species chemical labels. We calculated the Pearson correlation (*r*) between each analyte and the CAP axes in order to characterize the nature of species differences in volatile compound profiles, but not to attribute significance or to infer direct biological causation.

PRE-MATING ISOLATION

We evaluated the degree of pre-mating isolation between *C. diomedea* and *C. borealis* in the Chafarinas Islands by estimating the pair sexual isolation index (*I*_{PSI}) with the JMATING software (Carvajal-Rodriguez & Rolan-Alvarez, 2006). This index varies between -1 and 1, in case of a complete dissortative or complete assortative mating, respectively. The significance of the *I*_{PSI} value was tested by the bootstrap probability with 10 000 iterations. For this analysis, we analysed data from 14 breeding pairs where both partners had been sampled using the species assignment obtained from microsatellite data.

RESULTS

GENETIC ANALYSES

Departure from HW equilibrium was significant for all populations (Table 3). The presence of null alleles was suggested for Puff PM2 and Puff G11F in Linosa, for Puff PM2 in Selvagem and for Puff G11F in both species in the Chafarinas Islands using MICRO-CHECKER. As these deviations were moderate and measures of population differentiation such as *F*_{ST} are not very sensitive to heterozygote deficiency, we kept all loci for the following analyses.

No significant linkage disequilibrium was found, as the number of significant permutation tests (6 over 121 tests) was exactly as expected under the

Table 3. Data summary for the microsatellite loci and Hardy–Weinberg equilibrium test

Species	Population	<i>N</i>	<i>a</i>	<i>I</i> _O	<i>H</i> _E	<i>F</i> _{IS}	<i>P</i> -value
<i>C. borealis</i>	Chafarinas	12	3.6	0.34	0.43	0.25	<0.001
	Selvagem	42	5.2	0.45	0.49	0.09	<0.001
<i>C. diomedea</i>	Chafarinas	27	4.3	0.41	0.47	0.14	<0.001
	Linosa	42	4.1	0.36	0.43	0.18	<0.001

Note: *N* = number of sampled individuals, *a*: average number of alleles per locus; *H*_O and *H*_E = observed and unbiased expected heterozygosity (Nei, 1978) and *F*_{IS} = inbreeding coefficient within populations (Weir & Cockerham, 1984).

hypothesis of no disequilibrium. Note that some populations were monomorphic for some of the 12 loci hence the total number of pairwise tests is not 132 but lower.

GENETIC DIFFERENTIATION

The estimated *F*_{ST} values revealed strong differentiation between *C. borealis* and *C. diomedea* in both allopatric and sympatric populations but low differentiation between populations within the same species (*F*_{ST} > 0.11 and *F*_{ST} < 0.02, respectively; Table 4). Accordingly, the first axis of the FCA on microsatellite data clearly differentiated the two species (Fig. 2).

In addition, Bayesian clustering analysis (STRUCTURE) including the four populations identified two clusters (Fig. S1) that discriminate the two species well (Fig. 3). All Chafarinas individuals have an assignment probability to one of the two species higher than 0.8 (0.81–0.99; mean *q* = 0.97 ± 0.05 SD; Fig. 3). Mean assignment probabilities of Linosa and Selvagem individuals were not higher than for Chafarinas individuals (0.58–1; mean *q* = 0.97 ± 0.06 SD; Fig. 3).

The phylogenetic tree grouped all mtDNA haplotypes into two groups corresponding to the two species (Fig. 4). However, three Chafarinas individuals assigned to *C. diomedea* based on microsatellite genotype were placed within the *C. borealis* cluster: 6114440, 6096760 and 455NR (marked individuals in Fig. 4).

BIOMETRICS

The first axis of the PCA explained more than 81% of the total variance (81.15% for males and 83.42% for females) and was essentially a size axis, being strongly correlated with all measures (minimum correlation of –0.88, Table S2). The PCA revealed two morphologically distinct groups, one of larger size

Table 4. Pairwise *F*_{ST} between *C. borealis* and *C. diomedea* obtained from 13 loci.

Population	<i>C. borealis</i> from Selvagem	<i>C. diomedea</i> from the Chafarinas	<i>C. diomedea</i> from Linosa
<i>C. borealis</i> from the Chafarinas	0.018*	0.169**	0.18**
<i>C. borealis</i> from Selvagem	–	0.121**	0.115**
<i>C. diomedea</i> from the Chafarinas	–	–	0.0002

P* < 0.05, *P* < 0.001.

corresponding to *C. borealis* and one smaller corresponding to *C. diomedea* (Fig. 5). PCA plots suggested that six individuals from the Chafarinas Islands had an intermediate morphology: 6096760, 455NR, 188NR, 453NR2, 3210NR and 6155110 (highlighted individuals in Fig. 5).

UROPYGIAL SECRETIONS

Uropygial secretion data were available for 12 individuals from Linosa, 16 individuals from Selvagem and 39 individuals from the Chafarinas Islands, but the chemical profile of one individual from Chafarinas was not usable because of the absence of the biphenyl peak, making the standardization of the peak areas impossible for this individual. The proposed identification of the 17 compounds retained for further analyses are given in Table 2. Some are present in all individuals in various proportions, while others are present in some of the individuals only.

Considering all populations, the first three axes of an unconstrained 2D PCO explained 86.98% (Axis 1: 69.35%; Axis 2: 10.88%; Axis 3: 6.76%) of the total variation. The first and second PCO axes were very effective at discriminating between the chemical profiles associated with the species and location (Fig. 6). The visually apparent differences in the ordination was statistically significant for location (PERMANOVA: pseudo-*F*_{2,65} = 3.79, *P* = 0.009, Table S3) and species (PERMANOVA: pseudo-*F*_{1,65} = 48.55, *P* = 0.0001, Table S3). This significant chemical profile difference between locations was also found at the species scale (pseudo-*F*_{1,37} = 3.03, *P* = 0.04 for *C. diomedea* and pseudo-*F*_{1,27} = 7.12, *P* = 0.001 for *C. borealis*, Table S3).

Considering species as a group factor, we built a CAP model (using a subset of *m* = 7 PCO axes, Fig. 6) where

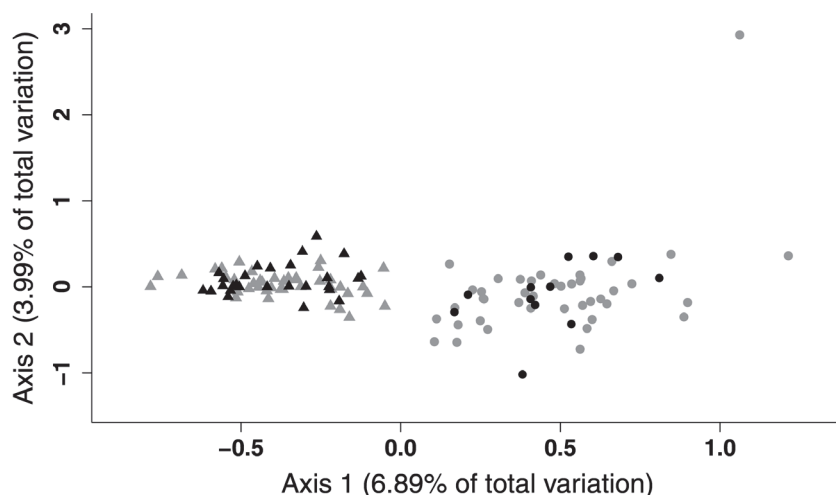


Figure 2. Factorial correspondence analysis showing relationships between the microsatellite multilocus genotypes of *C. borealis* (dots) and *C. diomedea* (triangles) populations. Black symbols = Chafarinas individuals, grey symbols = Linosa and Selvagem individuals. Axis 1 and axis 2 are the first and second principal factors of variability, respectively.

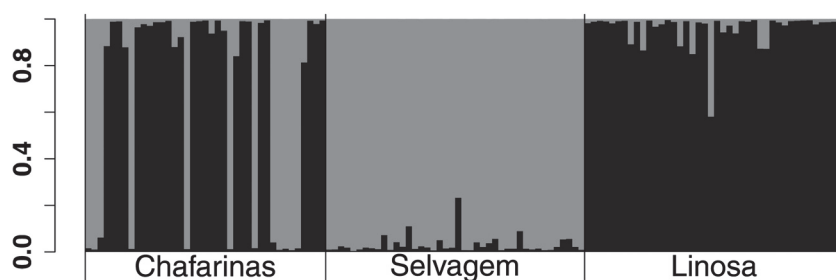


Figure 3. Bayesian clustering of genotypes of individuals performed in STRUCTURE with $K = 2$. Each individual is represented by a vertical line, with the probability of assignment to different clusters: dark grey for *C. diomedea* and light grey for *C. borealis*.

we had 3% of leave-one-out misclassification error between species. Secretions from two *C. diomedea* from the Chafarinas were misclassified as being from *C. borealis* (individual 6096760 and 455NR). Volatile components associated with the CAP model discriminating the two species' volatile compound profiles were primarily alcohols and alkene (Table 2). For example, *C. diomedea* had secretions with higher relative proportions of fatty alcohols (hexadecanol, octadecanol, nonadecanol and eicosanol) and alkene (eicosene, docosene and tetracosene). These compounds related to the species factor are the same molecules previously found in Gabirot *et al.* (2016).

Finally, we examined species effect in the Chafarinas Islands only. We found a significant difference between volatile compound profiles from *C. diomedea* and *C. borealis* in sympatry (pseudo- $F_{1,37} = 26.14$, $P = 0.0001$, Table S3). A CAP model using a subset of $m = 10$ PCO axes resulted in 2.6% of leave-one-out misclassification error between species. The secretion

from one *C. diomedea* from the Chafarinas Islands was misclassified as being from *C. borealis* (individual 6114890). The volatile components discriminating the two species in the Chafarinas islands were the same as in allopatry: hexadecanol, octadecanol, nonadecanol, docosene, eicosanol and tetracosene (Table 2).

The documented difference between species is thus due to the different relative proportion of a few of the volatile compounds, while the difference between locations is due to the variation in the relative proportion of other compounds than those responsible for inter-specific differences (see $r1$ and $r2$ in Table 2).

REPRODUCTIVE ISOLATION IN SYMPATRY

Detection of hybrids

The NEWHYBRIDS software did not identify F1 hybrids in the Chafarinas individuals: all individuals had a PP higher than 90% of being classified as either *C. diomedea* or *C. borealis*. Only 13% of simulated F1

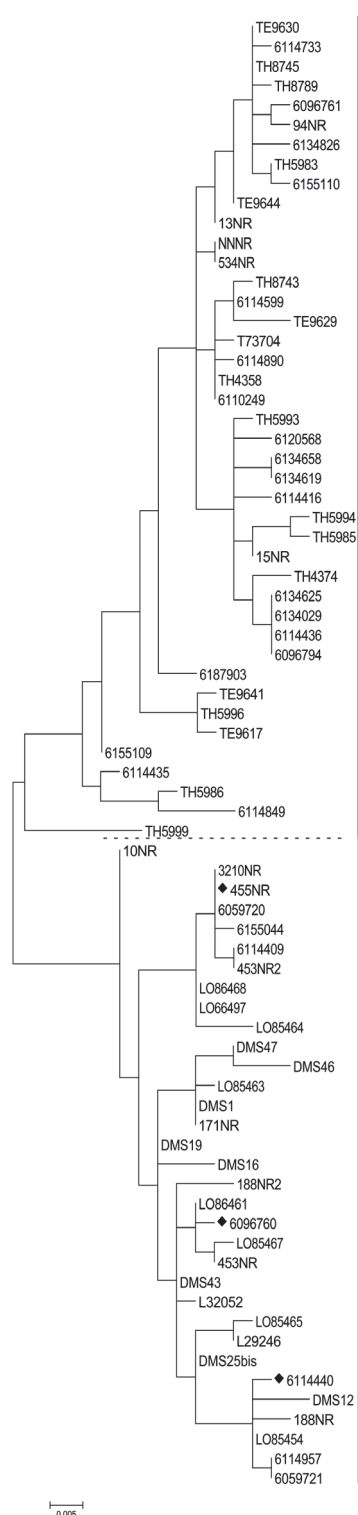


Figure 4. Phylogenetic tree of mtDNA haplotypes constructed from maximum likelihood where the marked individuals (◆) have a discrepancy assignment between microsatellite genotype and mtDNA haplotype. Dark grey for *C. diomedea* and light grey for *C. borealis*.

hybrids were erroneously assigned to *C. diomedea* or *C. borealis* by NEWHYBRIDS or were left unassigned (similar probabilities for F1 or pure specimens). This result suggests that the absence of identified F1 hybrids in the Chafarinas individuals is not entirely due to a low power to detect hybrids in our dataset. However, only 60% of simulated F1 individuals were identified with over 80% PP, clearly showing that some F1 hybrids in our sympatric samples could have been erroneously classified as pure individuals. Simulated F1 individuals overlapped with some Chafarinas individuals in the FCA plot, especially with some ‘mismatched’ individuals (marked individuals in Fig. 7). In total, we identified seven individuals from Chafarinas (out of 39) with variously discordant assignment between morphology, mtDNA, nuclear DNA or chemical profile (Table 5). We have not considered the individual 6114890 because in the PCO this bird is not intermediate but its position can be explained by other factors such as sampling, storage, extraction or analysis methods (Fig. 6).

Assortative mating

Using the species identification based on microsatellites, we detected only one mixed pair out of 14 in the sympatric colony (Table S4) and the I_{PSI} value indicated a strong and significant assortative mating (mean $q = 0.8046 \pm 0.179$ SD, $P = 0.013$). This heterospecific pair was formed with the *C. borealis* female 6114409 and the *C. diomedea* male 455NR. This male was assigned as *C. diomedea* by microsatellite assignment but had a *C. borealis* mtDNA haplotype and intermediate morphology and chemical label (Table 5).

DISCUSSION

We have confirmed the clear divergence in nuclear genome between the two sibling species of *Calonectris*, making it possible to examine their level of reproductive isolation. A comprehensive approach combining genetics, morphometry and chemical analysis has found strong evidence of assortative mating and a low level of introgression, suggesting the existence of an efficient species recognition system. We have also verified that chemical labels remain distinct in sympatry, which add them to the list of phenotypic differences (morphological and acoustics) that can potentially contribute to species recognition.

NUCLEAR GENETIC DIFFERENTIATION BETWEEN SIBLING SPECIES

Moderate but significant nuclear differentiation between *C. diomedea* and *C. borealis* was revealed

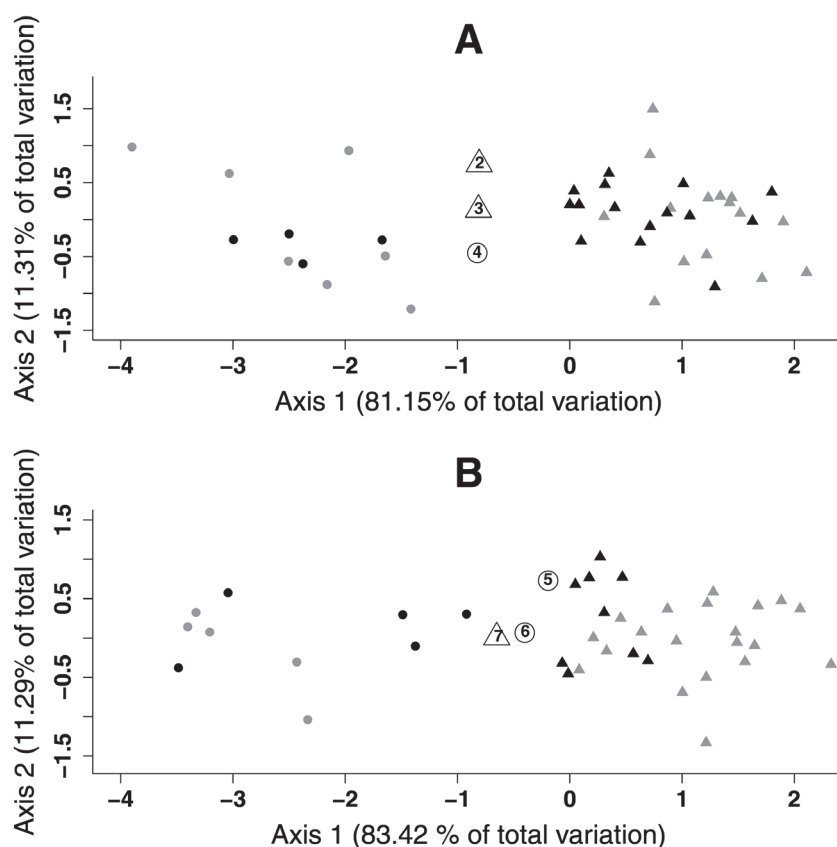


Figure 5. Principal component analysis based on three biometric measurements (maximum beak depth, tarsus length and wing length) of male (A) and female (B) individuals. Grey triangles and dots for Linosa and Selvagem individuals, respectively. Black triangles and dots for Chafarinas *C. diomedea* and Chafarinas *C. borealis* individuals, respectively. We marked six individuals which have an intermediate morphometry (2: 6096760, 3: 455NR, 4: 188NR, 5: 453NR2, 6: 3210NR and 7: 6155110; see also Fig. 7 and Table 5).

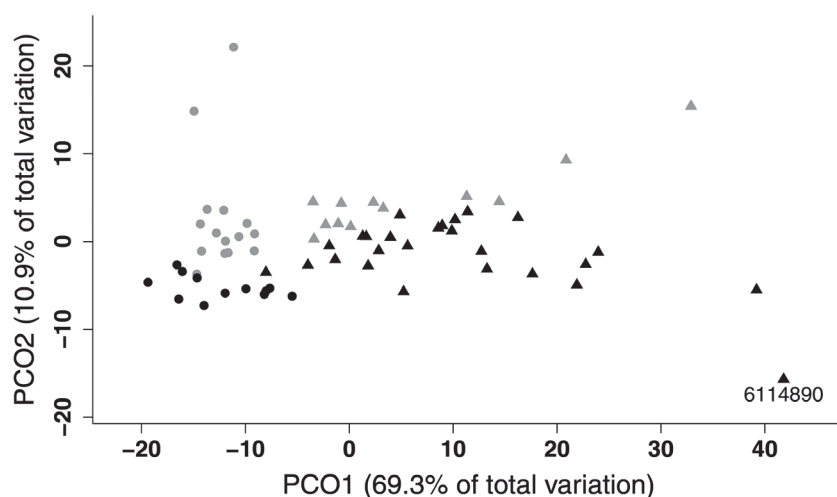


Figure 6. Bi-dimensional PCO ordinations of all uropygial secretion samples based on 17 chemical compounds: PCO1 vs. PCO2. Each symbol corresponds to a population (symbols and colours as in Fig. 2).

by non-overlapping clusters in the FCA (Fig. 2), two well-defined groups corresponding to the two species identified by Bayesian clustering analysis (Fig. 3) and significant F_{ST} values (Table 4). Our findings are thus at odds with the results of Genovart *et al.* (2013), who found extensive overlap in FCA between the two species and no genetic cluster corresponding to species identified by Bayesian clustering. This discrepancy is not entirely due to the larger number of loci we used (13 microsatellites vs. 6 in Genovart *et al.*'s study), because when we ran STRUCTURE on a subset of our data restricted to the same six loci as Genovart *et al.* (2013), we found an optimal $K = 2$ corresponding to the two species and mean assignment values close to 0.9 in all three populations. This suggests that the results from Genovart *et al.* (2013) might be partly due to some inadequate genotyping. Whatever the reasons for this difference, it is easier to reconcile our findings of significant nuclear differentiation, indicating reduced

nuclear gene flow, with the differences reported in mtDNA, acoustics, morphology, ecology (Navarro *et al.*, 2009; Afán *et al.*, 2014) and possibly migratory behaviour (González-Solís *et al.*, 2007). Maintaining all these phenotypic and behavioural differences in the face of gene flow strong enough to erase neutral divergence would require (probably unrealistic) strong divergent selection. Additionally, the recently published study of Munilla *et al.* (2016) similarly found clear separation of *C. diomedea* and *C. borealis* in nuclear DNA, reinforcing the idea that the lack of nuclear differentiation found by Genovart *et al.* (2013) was probably an artefact.

UNCOMMON HYBRIDIZATION

Our nuclear marker analyses indicated that *Calonectris diomedea* and *C. borealis* in sympatry are as divergent as in allopatry and no F1 hybrids were

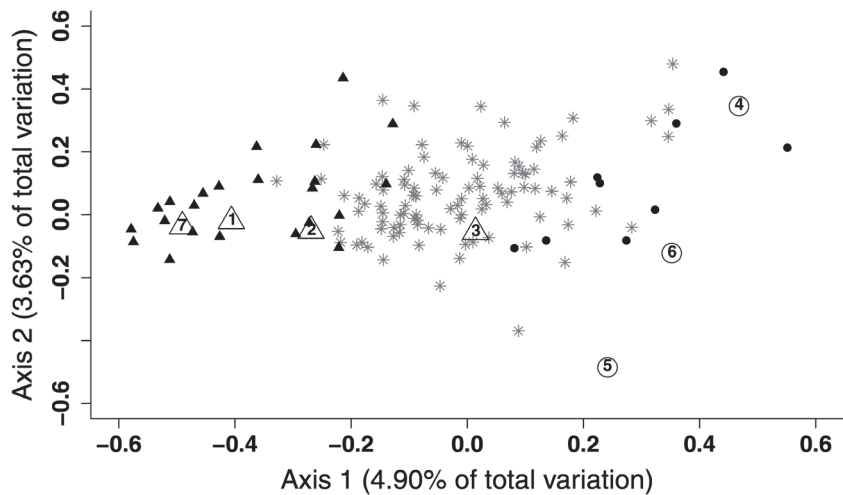


Figure 7. Factorial correspondence analysis showing relationships between the multilocus genotypes of *C. borealis* (dots) and *C. diomedea* (triangles) Chafarinas' population as well as HYBRIDLAB simulated F1 individuals (stars). Axis 1 and axis 2 are the first and second principal factors of variability, respectively. The marked individuals are those showing species assignment mismatches (1: 6114440, 2: 6096760, 3: 455NR, 4: 188NR, 5: 453NR2, 6: 3210NR and 7: 6155110; see Table 5).

Table 5. Summary of the discordant assignments between morphology, mtDNA, nuclear DNA or chemical profile of seven individuals

Individual ring		Nuclear genome	mtDNA haplotype	Morphometry	Chemical profile
6114440	(1)	D	B	D	D
6096760	(2)	D	B	I	I
455NR	(3)	D	B	I	I
188NR	(4)	B	B	I	B
453NR2	(5)	B	B	I	B
3210NR	(6)	B	B	I	B
6155110	(7)	D	D	I	D

Note: D: assigned as *C. diomedea*, B: as *C. borealis* and I: intermediate for this character.

detected. The lack of any identified F1 hybrids is possibly due to our low power of hybrid detection, but analysis of simulated hybrid genotypes shows that we cannot have missed many F1 hybrids. In addition, the persistence of genetic differentiation in sympatry can only be due to strong reproductive isolation or to very recent secondary contact. While there is no information about the timing of sympatry, strong assortative mating supports the idea that there is efficient pre-mating isolation between these species. Indeed, among the 14 breeding pairs studied, only one appeared to be heterospecific (455NR – ♂ *C. diomedea* and 6114409 – ♀ *C. borealis*), and it is interesting to highlight that individual 455NR shows genetic introgression and has intermediate morphometry and chemical label (Table 5). Assortative mating reduces the risk of hybridization and explains, at least in part, the low introgression observed between the two species. However, three Chafarinas individuals (6114440, 6096760 and 455NR; Table 5) had a *C. diomedea* microsatellite genotype and a *C. borealis* mitochondrial haplotype, indicating past introgression. This introgression, combined with the lack or rarity of recent hybrids, suggests that *C. diomedea* and *C. borealis* only occasionally hybridize. Furthermore, six individuals have intermediate morphometry (6096760, 455NR, 188NR, 453NR2, 3210NR and 6155110; Table 5) or chemical label (6096760 and 455NR; Table 5), which can be explained by gene flow between the parental populations and/or by environmental effects (phenotypic plasticity). Rare cases of hybridization between *C. diomedea* and *C. borealis* in allopatric colonies have previously been reported: a heterospecific pair raised a chick in the Columbretes Islands (Spain) in 2001 (Martínez-Abraín, Sanchez & Oro, 2002), two individuals in which phenotype and genotype did not match were observed in Mallorca (Balearic Island) and Tenerife (Canary Island) between 2001 and 2006 (Gómez-Díaz *et al.*, 2009) and a possibly heterospecific pair (or a pair involving hybrids) was reported by Thibault & Bretagnolle (1998). Clearly, hybridization and introgression are still possible between these two species but reproductive isolation is already well advanced. Further research is needed to know whether hybrids suffer from reduced fitness or whether reproductive isolation entirely rests on pre-mating isolation.

CHEMICAL LABEL DIFFERENCE IN SYMPATRY

We confirmed that these two sibling species have distinct chemical profiles (as previously suggested by Gabirot *et al.*, 2016) and we established for the first time that these differences are maintained in sympatry. This suggests that differences in the chemical composition of uropygial secretions are largely due to genetics

and not only to environmental factors. If the chemical label divergence was mainly due to environmental factors, a convergence in chemical profiles should be apparent in sympatry. Our study also confirmed that birds sampled in different years from different locations show small but significant differences in the chemical composition of their uropygial secretion (see also Gabirot *et al.*, 2016), suggesting that environmental factors (e.g. common foraging areas) may also affect chemical profiles (Haribal, Dhondt & Rodriguez, 2009). However, whether these differences are due to variation between breeding colonies or between sampling years (Mardon *et al.*, 2010) remains to be investigated.

CONCLUSIONS AND TAXONOMY REMARKS

Our results support the split of *Calonectris diomedea* and *C. borealis* into two full species. The taxonomic debate about the two subspecies *Calonectris diomedea diomedea* and *C. d. borealis* lasted for a long time (Heidrich, Amengual & Wink, 1998), and these two taxa were formally elevated to full species status only in 2012 (Sangster *et al.*, 2012). Our results show that the differences observed in allopatry in body size (Granadeiro, 1993), mitochondrial DNA (Gómez-Díaz *et al.*, 2006; Gómez-Díaz *et al.*, 2009) and in uropygial secretion composition (Gabirot *et al.*, 2016) are also maintained in sympatry, and we confirm a difference in nuclear DNA. In addition, our results reveal a strong assortative mating and a very low level of hybridization, providing evidence for the existence of a specific recognition system between the two species and supporting their species status.

To be effective, assortative mating needs an efficient species recognition mechanism. Our results suggest that odours constitute a candidate trait that may be involved in species recognition, in the avoidance of heterospecific mating and the formation of hybrids in *Calonectris* shearwaters. These seabirds are nocturnal and visual signals, including differences in body size, are unlikely to intervene in species recognition (Mougin, 2000; Bried *et al.*, 2010; Nava *et al.*, 2014). In fact, in these species, a negative assortative mating for height and bill length and a lack of assortative mating for tarsus and wing length was recently reported, suggesting that morphometric traits do not influence mate choice (Nava *et al.*, 2014). *Calonectris diomedea* and *C. borealis* differ in vocalizations (*C. diomedea* mating calls are made of two long syllables while *C. borealis* utters three shorter syllables; Bretagnolle & Lequette, 1990; Thibault & Bretagnolle, 1998) and this difference may constitute a recognition mechanism based on acoustic cues. This possible acoustic recognition mechanism does not exclude the coexistence of an olfactory one, which may contribute to an

enhanced specific recognition. Redundant mechanisms have already been reported in nature and probably account for better species recognition (Candolin, 2003). To know whether uropygial secretion composition plays a real role in species recognition, it would be necessary to realize specific behavioural tests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

GDA, MG, FB and PAC conceived the study; GDA collected all biometric measures; GDA, MG, AC and FB collected the other samples; TZ, MG and BB performed the GCMS analyses; TZ and PS performed the genetic analyses and TZ, GDA, MG, FB and PAC discussed results and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank for their help in obtaining research permits and for the logistic support during fieldwork: Bruno Massa and Salvatore Bonadonna in Linosa; Paulo Catry, José Pedro Granadeiro and the warden at the Nature Reserve in Selvagem Grande; Javier Zapata Salgado, Isabel Afán and the two wardens Paco and Ángel at the National Refugee of Chafarinas Islands. This study was authorized by the Regione Siciliana, Assessorato Agricoltura e Foreste, Prot. 17233 dated 1 December 2010; by the Serviço do Parque Natural da Madeira, licence n° 5/2011 and by the Organismo Autónomo Parques Nacionales, Marine Areas Program, licence n° ES6300001. The study was funded by a Marie Curie Intra-European Fellowship [PIEF-GA-2010-272282-SOMA], a Fyssen Foundation fellowship and a Travelling Fellowship by *Journal of Experimental Biology* all awarded to GDA. MG was supported by the Agence Nationale de la Recherche Française [AMBO ANR-08-BLAN-0117-01] and by a Marie Curie Intra-European Fellowship [FP7-PEOPLE-2013-IEF 625385-BIRDSCENTS].

REFERENCES

- Afán I, Navarro J, Cardador L, Ramírez F, Kato A, Rodríguez B, Ropert-Coudert Y, Forero MG. 2014. Foraging movements and habitat niche of two closely-related seabirds breeding in sympatry. *Marine Biology* **161**: 657–668.
- Amo L, Avilés JM, Parejo D, Peña A, Rodríguez J, Tomás G. 2012. Sex recognition by odour and variation in the uropygial gland secretion in starlings. *Journal of Animal Ecology* **81**: 605–613.
- Anderson EC, Thompson EA. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* **160**: 1217–1229.
- Anderson MJ. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**: 32–46.
- Anderson MJ, Willis TJ. 2003. Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. *Ecology* **84**: 511–525.
- Anderson MJ, Gorley RN, Clarke KR. 2008. *PERMANOVA+ for PRIMER: guide to software and statistical methods*. Plymouth, UK: Primer-E.
- Anderson MJ, Robinson J. 2003. Generalized discriminant analysis based on distances. *Australian & New Zealand Journal of Statistics* **45**: 301–318.
- Baker MC, Baker AEM. 1990. Reproductive behavior of female buntings: isolating mechanisms in a hybridizing pair of species. *Evolution* **44**: 332–338.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 1996. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000*: 1996–2004.
- BirdLife International. 2015. *The BirdLife checklist of the birds of the world: Version 8*. Available at: http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/Species/Taxonomy/BirdLife_Checklist_Version_80.zip. Last accessed date 14 February 2017.
- Bonadonna F, Nevitt GA. 2004. Partner-specific odor recognition in an Antarctic seabird. *Science (New York, N.Y.)* **306**: 835.
- Bonadonna F, Miguel E, Grosbois V, Jouventin P, Bessiere JM. 2007. Individual odor recognition in birds: an endogenous olfactory signature on petrels' feathers? *Journal of Chemical Ecology* **33**: 1819–1829.
- Bonadonna F, Mardon J. 2010. One house two families: petrel squatters get a sniff of low-cost breeding opportunities. *Ethology* **116**: 176–182.
- Bonadonna F, Sanz-Aguilar A. 2012. Kin recognition and inbreeding avoidance in wild birds: the first evidence for individual kin-related odour recognition. *Animal Behaviour* **84**: 509–513.
- Bonadonna F, Mardon J. 2013. Besides colours and songs, odour is the new black of avian communication. *Chemical Signals in Vertebrates* **12**: 325–339.
- Bretagnolle V, Lequette B. 1990. Structural variation in the call of the Cory's shearwater (*Calonectris diomedea*, Aves, Procellariidae). *Ethology* **85**: 313–323.
- Bried J, Dubois MP, Jouventin P, Santos RS. 2008. Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources* **8**: 602–604.
- Bried J, Dubois MP, Jarne P, Jouventin P, Santos RS. 2010. Does competition for nests affect genetic monogamy in Cory's shearwater *Calonectris diomedea*? *Journal of Avian Biology* **41**: 407–418.
- Brooke Mde L. 1989. Determination of the absolute visual threshold of a nocturnal seabird, the Common Diving Petrel *Pelecanoides urinatrix*. *Ibis* **131**: 290–300.
- Candolin U. 2003. The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **78**: 575–595.

- Caro SP, Balthazart J, Bonadonna F. 2015. The perfume of reproduction in birds: chemosignaling in avian social life. *Hormones and Behavior* **68**: 25–42.
- Carvajal-Rodriguez A, Rolan-Alvarez E. 2006. JMATING: a software for the analysis of sexual selection and sexual isolation effects from mating frequency data. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 40.
- Clarke KR, Warwick RM. 2001. *Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Plymouth (UK): PRIMER-E Ltd.
- Clarke KR, Gorley RN. 2006. *PRIMER v6: user manual / tutorial*. Plymouth (UK): PRIMER-E Ltd.
- Cobb S. 1968. The size of the olfactory bulb in 108 species of birds. *The Auk* **85**: 55–61.
- Coffin HR, Watters JV, Mateo JM. 2011. Odor-based recognition of familiar and related conspecifics: a first test conducted on captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). *PLoS One* **6**: e25002.
- Dell'Ariccia G, Célérier A, Gabirot M, Palmas P, Massa B, Bonadonna F. 2014. Olfactory foraging in temperate waters: sensitivity to dimethylsulphide of shearwaters in the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Journal of Experimental Biology* **217**: 1701–1709.
- Earl DA, von Holdt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359–361.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.
- Fatouros NE, Huigens ME, van Loon JJ, Dicke M, Hilker M. 2005. Chemical communication: butterfly anti-aphrodisiac lures parasitic wasps. *Nature* **433**: 704.
- Fridolfsson A, Ellegren H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* **30**: 116–121.
- Gabirot M, Raux L, Dell'Ariccia G, Bried J, González-Solís J, Buatois B, Crochet PA, Bonadonna F. 2016. Chemical labels differ between two closely related shearwater taxa. *Journal of Avian Biology* **47**: 1–12.
- Gagliardo A, Bried J, Lambardi P, Luschi P, Wikelski M, Bonadonna F. 2013. Oceanic navigation in Cory's shearwaters: evidence for a crucial role of olfactory cues for homing after displacement. *Journal of Experimental Biology* **216**: 2798–2805.
- Genovart M, Thibault JC, Igual JM, Bauzá-Ribot Mdel M, Rabouam C, Bretagnolle V. 2013. Population structure and dispersal patterns within and between Atlantic and Mediterranean populations of a large-range pelagic seabird. *PLoS One* **8**: e70711.
- Gill F, Donsker D. 2014. *IOC World Bird List v4.2*. International Ornithologists Union Committee on Nomenclature. Available at: <https://doi.org/10.14344/IOC.ML.4.0>. Last accessed date 14 February 2017.
- Gómez-Díaz E, González-Solís J, Peinado MA, Page RD. 2006. Phylogeography of the *Calonectris* shearwaters using molecular and morphometric data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **41**: 322–332.
- Gómez-Díaz E, González-Solís J, Peinado MA. 2009. Population structure in a highly pelagic seabird, the Cory's shearwater *Calonectris diomedea*: an examination of genetics, morphology and ecology. *Marine Ecology Progress Series* **382**: 197–209.
- González-Solís J, Croxall JP, Oro D, Ruiz X. 2007. Transequatorial migration and mixing in the wintering areas of a pelagic seabird. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**: 297–301.
- González EG, Genovart M, Oro D, Zardoya R, Juste J. 2009. Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwater, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1044–1046.
- González-Solís J, Croxall JP, Oro D, Ruiz X. 2007. Trans-equatorial migration and mixing in the wintering areas of a pelagic seabird. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**: 297–301.
- Gower JC. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**: 325–338.
- Granadeiro JP. 1993. Variation in measurements of Cory's shearwater between populations and sexing by discriminant analysis. *Ringed & Migration* **14**: 103–112.
- Grant PR, Grant BR. 1997. Hybridization, sexual imprinting, and mate choice. *The American Naturalist* **149**: 1–28.
- Gutierrez R. 1998. Flight identification of Cory's and Scopoli's shearwaters. *Dutch Birding* **20**: 216–225.
- Haribal M, Dhondt A, Rodriguez E. 2009. Diversity in chemical compositions of preen gland secretions of tropical birds. *Biochemical Systematics and Ecology* **37**: 80–90.
- Heidrich P, Amengual J, Wink M. 1998. Phylogenetic relationships in Mediterranean and North Atlantic shearwaters (Aves: Procellariidae) based on nucleotide sequences of mtDNA. *Biochemical Systematics and Ecology* **26**: 145–170.
- Jacob J, Ziswiler V. 1982. The uropygial gland. In: Farner DS, King JR, Parkes KC, eds. *Avian biology*, Vol. 6. New York: Academic Press, 199–324.
- Jakobsson M, Rosenberg NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**: 1801–1806.
- Karlsson AC, Jensen P, Elgland M, Laur K, Fyrner T, Konradsson P, Laska M. 2010. Red junglefowl have individual body odors. *Journal of Experimental Biology* **213**: 1619–1624.
- Krause ET, Brummel C, Kohlwey S, Baier MC, Müller C, Bonadonna F, Caspers BA. 2014. Differences in olfactory species recognition in the females of two Australian songbird species. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **68**: 1819–1827.
- Leclaire S, Merckling T, Raynaud C, Giacinti G, Bessière JM, Hatch SA, Danchin E. 2011. An individual and a sex odor signature in kittiwakes? Study of the semiochemical composition of preen secretion and preen down feathers. *Die Naturwissenschaften* **98**: 615–624.
- Leclaire S, Merckling T, Raynaud C, Mulard H, Bessière JM, Lhuillier E, Hatch SA, Danchin E. 2012. Semiochemical compounds of preen secretion reflect genetic

- make-up in a seabird species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 1185–1193.
- Mardon J, Bonadonna F. 2009.** Atypical homing or self-odour avoidance? Blue petrels (*Halobaena caerulea*) are attracted to their mate's odour but avoid their own. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63**: 537–542.
- Mardon J, Saunders SM, Anderson MJ, Couchoux C, Bonadonna F. 2010.** Species, gender, and identity: cracking petrels' sociochemical code. *Chemical Senses* **35**: 309–321.
- Mardon J, Saunders SM, Bonadonna F. 2011.** From preen secretions to plumage: the chemical trajectory of blue petrels' *Halobaena caerulea* social scent. *Journal of Avian Biology* **42**: 29–38.
- Martin GR, Brooke Mde L. 1991.** The eye of a procellariiform seabird, the Manx shearwater, *Puffinus puffinus*: visual fields and optical structure. *Brain, Behavior and Evolution* **37**: 65–78.
- Martín J, López P. 2014.** Pheromones and chemical communication in lizards. In: Rheubert JL, Siegel DS, Trauth SE, eds. *The reproductive biology and phylogeny of Lizards and Tuatara*. Boca Raton, FL: CRC Press, 43–77.
- Martínez-Abraín A, Sanchez A, Oro D. 2002.** Atlantic Cory's Shearwaters breeding in a colony of Mediterranean Cory's Shearwaters. *Waterbirds* **25**: 221.
- McArdle BH, Anderson MJ. 2001.** Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* **82**: 290–297.
- Mougeot F, Bretagnolle VV. 2000.** Predation as a cost of sexual communication in nocturnal seabirds: an experimental approach using acoustic signals. *Animal Behaviour* **60**: 647–656.
- Mougin JL. 2000.** Pairing in the Cory's Shearwater (*Calonectris diomedea*) of Selvagem Grande. *Journal für Ornithologie* **141**: 319–326.
- Munilla I, Genovart M, Paiva VH, Velando A. 2016.** Colony foundation in an Oceanic Seabird. *PLoS One* **11**: e0147222.
- Nava CP, Kim SY, Magalhães MC, Neves V. 2014.** Do Cory's Shearwaters *Calonectris borealis* choose mates based on size? *Journal of Ornithology* **155**: 869–875.
- Navarro J, Forero MG, González-Solís J, Igual JM, Bécáres J, Hobson KA. 2009.** Foraging segregation between two closely related shearwaters breeding in sympatry. *Biology Letters* **5**: 545–548.
- Nielsen EE, Bach LA, Kotlicki P. 2006.** HYBRIDLAB (version 1.0): a program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes* **6**: 971–973.
- Panhuis TM, Butlin R, Zuk M, Tregenza T. 2001.** Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 364–371.
- Price TD. 2008.** *Speciation in birds*. Greenwood Village, CO: Roberts and Company.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- R Core Team. 2015.** *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Sangster G, Collinson JM, Crochet PA, Knox AG, Parkin DT, Votier SC. 2012.** Taxonomic recommendations for British birds: eight report. *Ibis* **154**: 874–883.
- Smadja C, Butlin RK. 2009.** On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity* **102**: 77–97.
- Soini HA, Whittaker DJ, Wiesler D, Ketterson ED, Novotny MV. 2013.** Chemosignaling diversity in songbirds: chromatographic profiling of preen oil volatiles in different species. *Journal of Chromatography A* **1317**: 186–192.
- Taga ME, Bassler BL. 2003.** Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** (Suppl): 14549–14554.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725–2729.
- Thibault JC, Bretagnolle V. 1998.** A Mediterranean breeding population of Cory's shearwater which shows behavioural and biometrical characters of the Atlantic subspecies. *Ibis* **140**: 523–528.
- Van Oosterhout C, Joyce DA, Cummings SM, Blais J, Barson NJ, Ramnarine IW, Mohammed RS, Persad N, Cable J. 2006.** Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **60**: 2562–2574.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.
- Whittaker DJ, Soini HA, Atwell JW, Hollars C, Novotny MV, Ketterson ED. 2010.** Songbird chemosignals: volatile compounds in preen gland secretions vary among individuals, sexes, and populations. *Behavioral Ecology* **21**: 608–614.
- Wyatt TD. 2014.** Semiochemicals and social organization. In: *Pheromones and animal behaviour: chemical signals and signatures*. New York, NY: Cambridge University Press. 126–148.
- Zhang YH, Du YF, Zhang JX. 2013.** Uropygial gland volatiles facilitate species recognition between two sympatric sibling bird species. *Behavioral Ecology* **24**: 1271–1278.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Figure S1. Evolution of the Evanno *ad hoc* statistic *DK* for the estimation of the number of clusters *K* for all sampled.

Table S1. Details of the six multiplex sets including the 13 microsatellites.

Table S2. Mean morphological measurements (mm) by population, species and sex. Values are mean $\pm$ SD. Sample size for each category is shown in brackets.

Table S3. Resume of PERMANOVA results.

Table S4. Summary of sampled breeding pairs' composition from the Chafarinas (bold numbers). *N* = number of individuals.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Details of the six multiplex sets including the 13 microsatellites.

Multiplex	Locus	T anealling
A	Cd1, Cd3	58°C
B	Cd4, Cd5, Cd6	58°C
C	Cd2, Cd8, Cd9	58°C
1	Puff G2C	50°C
2	Puff PM2, Puff C5A	58°C
3	Puff G2F, Puff G11F	60°C

Figure S1. Evolution of the Evanno *ad hoc* statistic DK for the estimation of the number of clusters K for all sampled.

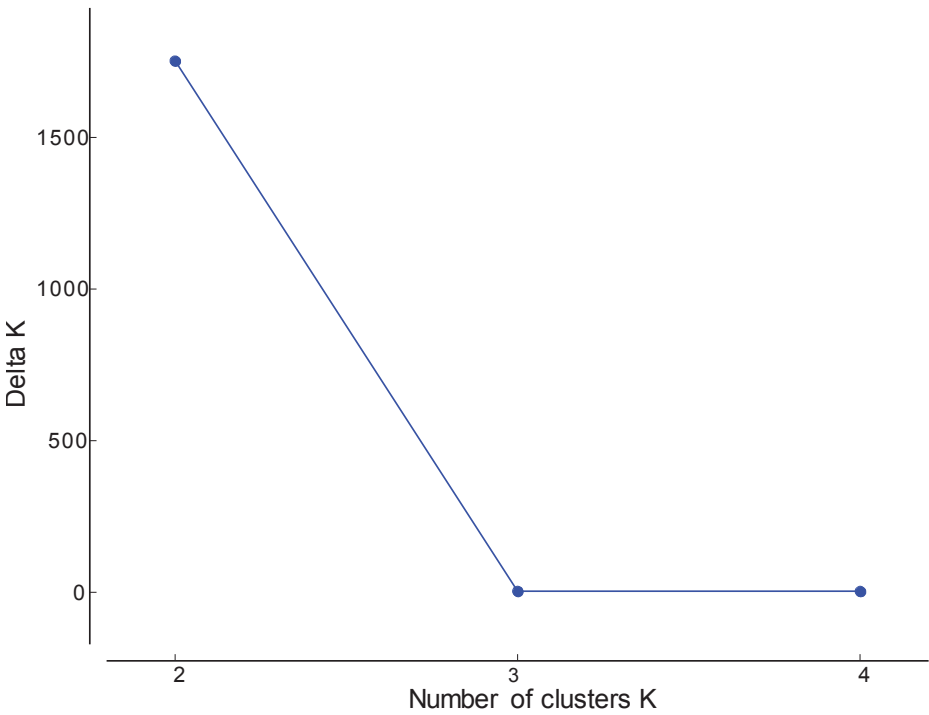


Table S2. Mean morphological measurements (mm) by population, species and sex. Values are means $\pm$ standard deviations. Sample size for each category is shown in brackets.

Morphometric measure	Population	<i>C. borealis</i> from the Chafarinas	<i>C. borealis</i> from Selvagem	<i>C. diomedea</i> from the Chafarinas	<i>C. diomedea</i> from Linosa
Beak length 1	<i>Males</i>	56.60 $\pm$ 1.05 (5)	57.60 $\pm$ 1.51 (13)	51.19 $\pm$ 1.95 (16)	NA
	<i>Females</i>	51.20 $\pm$ 1.77 (6)	55.00 $\pm$ 1.87 (13)	48.71 $\pm$ 1.81 (9)	NA
Beak length 2	<i>Males</i>	56.80 $\pm$ 0.84 (5)	NA	52.27 $\pm$ 1.51 (17)	52.33 $\pm$ 1.40 (15)
	<i>Females</i>	52.00 $\pm$ 1.10 (7)	NA	49.56 $\pm$ 1.45 (10)	49.00 $\pm$ 1.50 (21)
Maximum beak depth	<i>Males</i>	22.10 $\pm$ 0.76 (5)	22.90 $\pm$ 0.84 (13)	19.48 $\pm$ 0.61 (17)	19.39 $\pm$ 0.70 (15)
	<i>Females</i>	19.00 $\pm$ 1.03 (7)	20.50 $\pm$ 0.58 (12)	17.79 $\pm$ 0.57 (10)	17.54 $\pm$ 0.86 (21)
Beak depth at nostril	<i>Males</i>	15.80 $\pm$ 0.70 (5)	NA	13.89 $\pm$ 0.80 (16)	NA
	<i>Females</i>	13.50 $\pm$ 0.36 (5)	NA	12.73 $\pm$ 0.46 (9)	NA
Beak depth at gonys	<i>Males</i>	16.40 $\pm$ 0.59 (5)	17.30 $\pm$ 0.45 (13)	14.61 $\pm$ 0.64 (17)	NA
	<i>Females</i>	14.60 $\pm$ 0.84 (7)	15.60 $\pm$ 0.50 (13)	13.32 $\pm$ 0.38 (10)	NA
Tarsus length	<i>Males</i>	59.10 $\pm$ 1.39 (5)	60.20 $\pm$ 3.01 (7)	56.36 $\pm$ 1.58 (17)	55.10 $\pm$ 1.82 (15)
	<i>Females</i>	57.00 $\pm$ 1.70 (7)	58.60 $\pm$ 1.31 (6)	54.85 $\pm$ 1.02 (10)	53.14 $\pm$ 1.24 (21)
Wing length	<i>Males</i>	37.90 $\pm$ 0.73 (5)	37.50 $\pm$ 0.66 (7)	35.96 $\pm$ 0.68 (17)	35.15 $\pm$ 0.49 (15)
	<i>Females</i>	36.50 $\pm$ 0.81 (7)	37.10 $\pm$ 0.68 (5)	35.20 $\pm$ 0.46 (10)	34.39 $\pm$ 0.60 (21)

13 **Table S3:** Resume of PERMANOVA results.

	Factor	Pseudo-F	P-value
All (both species in three locations)	Location	$F_{2,65} = 3.79$	0.009
	Species	$F_{1,65} = 48.55$	0.0001
<i>C. diomedea</i>	Location	$F_{1,37} = 3.03$	0.04
<i>C. borealis</i>	Location	$F_{1,27} = 7.12$	0.001
Allopatry (Linosa and Selvagem)	Species	$F_{1,27} = 18.76$	0.0001
Sympatry (Chafarinas)	Species	$F_{1,37} = 26.14$	0.0001

14

15 **Table S4.** Summary of sampled breeding pairs' composition from the Chafarinas (bold
16 numbers). N = number of individuals.

17

SEX	Male		
Female	SPECIES	<i>C. borealis</i> <i>C. diomedea</i>	
		N	4 10
	<i>C. borealis</i>	5	4 1
	<i>C. diomedea</i>	9	0 9

18

ANNEXE 2

Anal scent gland secretions inform on sexual maturity, sex and social status in the Alpine marmot, *Marmota marmota* (Rodentia: Sciuridae): a role in intrasexual competition in cooperative breeders?

TIMOTHÉE ZIDAT^{1*}, ANNE-BÉATRICE DUFOUR¹, GUILLAUME MEIFFREN²,
MARIANNE GABIROT³, GILLES COMTE² and DOMINIQUE ALLAINÉ¹

¹Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Laboratoire Biométrie et Biologie Evolutive, 43 bd du 11 novembre 1918, F-69622, Villeurbanne, France

²Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5557, Laboratoire d'Ecologie Microbienne, 43 bd du 11 novembre 1918, F-69622, Villeurbanne, France

³Université de Montpellier, Université Paul-Valéry Montpellier, EPHE, CNRS, UMR 5175, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

Received 28 April 2018; revised 19 July 2018; accepted for publication 19 July 2018

In cooperative breeders, reproductive skew is extreme and leads to intense intrasexual competition for access to reproduction in both sexes. Given that securing the dominant position is costly, dominant animals should direct their aggressiveness towards same-sex subordinates that are potential competitors. Chemical communication has been reported to be involved in intrasexual competition in several mammalian species, and odour may be used as a cue to identify potential competitors. We predicted that odour should inform on sexual maturity, sex and social status in cooperative breeders. We tested these predictions in the Alpine marmot, a cooperatively breeding species, in which anal gland secretions are involved in aggressive behaviour. We sampled anal gland scents from 154 individuals of differing sexual maturity status, sex and social status. We found that anal gland secretions may inform on sexual maturity. When focusing on adult individuals, we found that anal gland scent differed according to sex and social status. Our results support the hypothesis that anal gland scent could be involved in intrasexual competition in Alpine marmots by allowing dominant individuals to target their aggressiveness towards same-sex competitors (i.e. sexually mature subordinates), resulting in the reproductive suppression of subordinates.

ADDITIONAL KEYWORDS: chemical label – dominance status – gas chromatography–mass spectrometry – odour cues – olfaction – sexual maturation – social species – wild population.

INTRODUCTION

Reproductive skew is extreme in singularly breeding species where a pair of dominant breeders is helped by non-reproducing subordinates (Silk, 2007). In cooperative breeders, this skew generates an intense intrasexual competition for access to dominance (and therefore to reproduction) in both sexes (Hauber & Lacey, 2005; Clutton-Brock *et al.*, 2006; Clutton-Brock & Huchard, 2013). Indeed, individuals that reach sexual maturity in those species may disperse in search of a dominant position in another family group or delay dispersal

and stay in their family group as sexually mature but non-reproductive subordinates. Sexually mature subordinates that delay dispersal thus become potential competitors for the same-sex dominant, and this generates intrasexual competition within the family group. The risk of losing the dominant status compels dominant individuals to try to control the behaviour of subordinates to solve conflicts over dominance, and thus over reproduction (Cant & Johnstone, 2009; Clutton-Brock, 2009). Usually, they manage to secure their social status (and consequently their access to reproduction) either by expelling competitors from their social group (Dobson, 1982; Clutton-Brock *et al.*, 1998; Johnstone & Cant, 1999; Cant *et al.*, 2010) or by suppressing the

*Corresponding author. E-mail: timoth.zidat@gmail.com

reproduction of subordinates (Magrath *et al.*, 2004; Saltzman *et al.*, 2008; Young, 2009). Given that securing the dominant position is costly (e.g. by suppressing the reproduction of subordinates; Bell *et al.*, 2012), dominant individuals should target their aggressiveness towards potential same-sex competitors (Young, 2009; Clutton-Brock & Huchard, 2013). This requires dominant individuals to be able to recognize those competitors and subordinate individuals to be able to recognize the animals they have to challenge. Dominant and subordinate individuals can mutually identify themselves using different non-exclusive sources of information, such as visual (posture and behaviour), acoustic and olfactory cues (Candolin, 2003; Bretman *et al.*, 2011).

Chemical communication is widely used in the animal kingdom, and many studies have provided evidence for the importance of chemical communication in reproduction and social interactions (for review, see Johansson & Jones, 2007; Wyatt, 2014). Mammal scents provide information about signallers, such as species identity (e.g. delBarco-Trillo *et al.*, 2011, 2012; Zabaras *et al.*, 2005), but also individual identity [scent may code for sex (e.g. MacDonald *et al.*, 2008; Kean *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2014), age (e.g. Buesching *et al.*, 2002; Kean *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2014) or sexual maturity (adult vs. subadult; e.g. Linklater *et al.*, 2013; Vaglio *et al.*, 2016; Spence-Aizenberg *et al.*, 2018)]. Several studies also reported that scent may inform on social status (e.g. Burgener *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010; Tinnesand *et al.*, 2013). Signalling of the social status of an individual has been interpreted in the context of intraspecific communication and territorial behaviour. Indeed, this information may be used in assessment of competitors by allowing conspecifics to evaluate the potential threat posed by an intruder (Gosling & Roberts, 2001; Tinnesand *et al.*, 2013). Chemical communication in relationship to intrasexual competition is expected to occur in cooperative breeders but is still poorly documented (Ziegler, 2013). If dominant individuals and subordinate competitors are able to recognize each other using chemical signals, we make the following predictions:

1. Odour should inform on sexual maturity. Therefore, we expect the odour of sexually mature individuals (adult animals) to be different from that of immature individuals.
2. Odour should inform on sex in adult individuals because competition for dominance (and reproduction) in singular breeders mainly occurs among same-sex individuals. Among adult individuals, we expect that odour should differ between males and females.
3. Odour should inform on social status in adult individuals. Therefore, we expect dominant individuals to have different odours from subordinate ones.

The Alpine marmot (*Marmota marmota*) is well suited to test these predictions. The Alpine marmot is a socially monogamous and cooperatively breeding species that lives in family groups of two to 20 individuals (Allainé, 2000). A family group is typically composed of a dominant pair, adult subordinates (sexually mature but non-reproducing) and immature (pups and yearlings) individuals of both sexes (Allainé *et al.*, 2000). Individuals of both sexes stay in their family group until they reach sexual maturity when 2 years old. Then, they can either disperse to gain dominance in another family group or delay dispersal and become potential competitors for the same-sex dominants in their family group (Allainé, 2000). Intrasexual competition for dominance occurs year-round and may result in the current dominant individual being evicted, evicting same-sex adult competitors or suppressing the reproduction of non-evicted subordinates (Arnold & Dittami, 1997; Hackländer *et al.*, 2003). This suppression is physiological and mediated mainly through aggression towards sexually mature subordinates (Hackländer *et al.*, 2003). Reproductive suppression is complete in subordinate females, whereas some subordinate males can successfully gain some extra-pair paternity (Goossens *et al.*, 1998; Cohas *et al.*, 2006).

Some observations suggest that chemical communication is involved in intrasexual competition in the Alpine marmot. Alpine marmots have three anal gland papillae that can be protruded from the anus, but their function is poorly known. However, this gland seems not to be used in territory scent marking (which is instead done by cheek rubbing with orbital glands; Bel *et al.*, 1995) but may still be used in intrasexual competition. Indeed, during encounters between adult members of a group, individuals often closely circle each other with flagging tails and then seem to expose their anal glands (D.A., pers. obs.), a behaviour also described during aggressive interactions between male yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*) (Armitage, 2014).

Here, we investigate the chemical composition of anal gland secretions in a wild population of Alpine marmots, using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). We aim to compare the chemical composition of individual marmot scents, which may differ according to sexual maturity status, sex and social status, and to identify which compounds are involved in these possible differences. We predict that the chemical composition of Alpine marmot anal gland scents is used in social recognition, particularly for intrasexual competition between same-sex individuals.

MATERIAL AND METHODS

Our study site was located in the nature reserve of La Grande Sassièr (French Alps) at an elevation of 2400 m. Alpine marmots emerge from hibernation in early

April, and mating occurs during the 2 or 3 weeks after emergence (Psenner, 1957). Dominant females gestate for 30 days, and lactate pups in their natal burrows for 40 days; therefore, pups emerge between mid-June and mid-July (Psenner, 1960; Arnold, 1990). Between mid-May and mid-July 2016, we captured 154 Alpine marmots (detailed in Table 1) from 21 family groups using two-door live traps placed near the main burrows of each territory and baited with dandelions (*Taraxacum densleonis*). We tranquilized individuals using Zoletil 100 (0.1 mL kg⁻¹) and identified each animal with a transponder and a numbered ear-tag (placed on the right for the females and on the left for the males, for easier identification during field observations). Dominant individuals were also recognizable from a coloured plastic tag attached on the opposite ear. We estimated the social status of each adult (dominant vs. subordinate) based on scrotal development for males and development of teats for females, and we confirmed our assessment by behavioural observations (territorial scent markings; Bel *et al.*, 1995, 1999).

ETHICAL NOTE

The two-door live traps were checked every half hour to limit the time spent by a marmot in a trap and thus reduce its exposure to predators and the weather. Once captured, marmots were transferred in an opaque jute bag (to limit stress) to a field laboratory room where handling occurred. Once tranquilized, handling lasted a maximum of 10 min. The recovery did not require the use of an antidote, and the marmots were placed in a cool, quiet room for 15 min after handling to recover, until they were able to walk. All tranquilized marmots recovered well, and no adverse effects were noticed; all individuals were observed alive the day after their capture. Tranquilization of pregnant or lactating females did not have any obvious impact upon their offspring, because all the females successfully raised offspring to weaning. Overall, individuals were absent from their territory for a maximum of 40 min, and we never observed exclusion from the territory for any

individual of any age after capture. Marmots were tranquilized no more than once a year and, in case of recapture the same year, the marmot was weighed and then released without additional handling.

All handling and sampling were done by T.Z. and Sylvia Pardonnet, who are authorized for experimentation with animals by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (diploma no. R69UCBL-ENVL-F1-03 and no. R-13CNRS-F1-10). The protocol was approved by the University of Lyon 1 Ethical Committee (CEEA-55, protocol BH2012-92-V1), and the authorization to capture Alpine marmots was issued by the Préfecture de Savoie (arrêté préfectoral no. 2017/41) after approval by the advisory committee of the Nature Reserve of La Grande Sassièr.

COLLECTION OF SCENT SAMPLES

After the Alpine marmots had been tranquilized, the anal glands were cleaned with ethanol to remove any environmental contaminants. Then, we collected odoriferous secretions by gently squeezing the area around the gland, wearing clean nitrile gloves to avoid contamination by human chemicals. Each sample was collected with a 50 µL glass capillary and placed into a 1.5 mL opaque chromatographic glass vial filled with 200 µL of dichloromethane solvent (HiPerSolv CHROMANORM for HPLC; VWR, Center Valley, PA, USA). In each 200 µL we added an internal standard, biphenyl (molecular weight, 154.21 g mol⁻¹, 99.5%; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at a concentration of 0.2 g L⁻¹. Vials were sealed with a Teflon-lined cap and stored at -20 °C in the field and at -80 °C in the laboratory until GC-MS analysis. In addition to these scent samples, several 'field control samples' (i.e. with solvent but without marmot secretions) were collected using the same protocol, to identify potential contaminants.

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY ANALYSIS

Just before GC-MS analyses, we transferred all liquid scent samples (including 'field control samples') to 0.3 mL inserts in new, clean vials. We used an interfaced Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph system equipped with a non-polar DB-5 MS column (30 m long × 0.25 mm internal diameter × 0.25 µm film thickness; Agilent Technologies) coupled with an HP 5973 MDS (mass selective detector) mass spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). We used helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹ and an electron impact ionization of 70 eV. The temperature of injection was set to 300 °C, and 1 µL of sample was injected automatically in splitless mode after being vortexed to homogenize the scent sample. The oven temperature programme started with 4 min at 90 °C, then increased by 12 °C min⁻¹ up to 210 °C,

Table 1. Number of animals sampled according to sexual maturity status, social status and sex

Sexual maturity status	Immature		Sexually mature			
			Subordinate		Dominant	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of animals	57	34	22	11	14	16

Immature individuals are pups and yearlings. Sexually mature subordinates were 2 ($N = 28$) or 3 years old ($N = 4$), and dominant individuals were 3 years old ($N = 5$) or older, up to 12 years old ($N = 25$).

and then increased again by 5 °C min⁻¹ up to 310 °C, and finally was held at 310 °C for 5 min, resulting in a total programme time of 39 min. We ran blank samples containing only 200 µL of dichloromethane every seven samples. These controls provided an estimate of the potential noise related to the potential accumulation of some compounds along the column, for example.

IDENTIFICATION OF COMPOUNDS

We tentatively identified anal gland secretion compounds using the Kovats retention index (RI) and the mass spectrum obtained by Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (B.07.01 version), which were then cross-checked with the National Institute of Standards and Technology (NIST) WebBook. We calculated RIs of compounds by means of a mixture of C₇–C₄₀ alkanes with known RIs (Supelco; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA; 1000 µg mL⁻¹ diluted at 1:100 in hexane) run in identical gas chromatographic conditions. Whenever possible, we proposed the name of a compound or its chemical family.

CHEMICAL ANALYSES

Data acquisition and pretreatment

The area of every peak (i.e. integration of the area under the curve) was obtained by an automatic integration with Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (B.07.01 version), and we manually checked each integration to avoid software errors. Then, we used AMDIS (automated mass spectral deconvolution and identification system) software to control the mass spectral similarity of peaks between all samples, in order to be sure of the peak identification from one individual to another. Furthermore, the internal standard (biphenyl) was used to control instrument drift over time. Three compounds were found in all field control samples and in all scent samples and were therefore considered as contaminants and removed from the analyses. We also removed compounds found in < 5% of the total individuals because they were considered to be too rare to contribute to the discrimination of each group (e.g. Harris *et al.*, 2012). Then, we calculated the relative abundance of each compound by converting each single peak area into a percentage of the sum of all compound areas for a given individual. Finally, we removed peaks with a relative abundance < 0.05% to exclude background noise (Drea *et al.*, 2013), and we square-root transformed the final data set to reduce the impact of the most abundant compounds upon our analyses (Clarke & Warwick, 2001).

Statistical analyses

We first tested the prediction that the odour of sexually mature individuals is different from that of immature

individuals. We also tested whether odour informs on sex and differs between males and females. For that, we calculated Euclidean distances between every pair of samples to produce a resemblance matrix, from which we conducted a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; Anderson, 2001, 2017), using 9999 permutations on the full final data set to test whether chemical profiles differed according to sexual maturity status and sex.

As proposed by Drea *et al.* (2013), we carried out a principal components analysis on the correlation matrix to reduce the number of compounds and to highlight only those that explain most of the variance. We decided to retain compounds with a cumulative contribution on the first three axes > 50% of the total contribution. We then conducted a second PERMANOVA on the chemical data subset to check that this compound selection did not change results obtained with the first PERMANOVA. Finally, we performed a linear discriminant analysis (LDA) on the chemical data subset to investigate whether variation in the chemical composition of anal gland scents can be used to separate individuals according to their sexual maturity status and to their sex, and we specified the chemical compounds implicated in the previous analyses.

In a second step, we focused on sexually mature individuals, to test predictions that odour informs on sex and social status in adult individuals. We selected sexually mature individuals (*N* = 63) and again removed compounds found in < 5% of adult individuals. As before, we conducted a PERMANOVA using the same parameters, to test whether chemical profiles differed according to sex and social status. We used the same compound selection as before to conduct the second PERMANOVA, to verify that this selection would not change results. Finally, we performed an LDA on the chemical data subset, to investigate whether variation in the chemical composition of anal gland scents allows separation of sexually mature individuals by their sex and social status, and we again specified the chemical compounds implicated in the previous analyses.

All statistical analyses were conducted in R v. 3.4.3 (R Core Team, 2017), with 'ade4' (Dray & Dufour, 2007) and 'adegraphics' packages (Siberchicot *et al.*, 2017) for principal components analysis, the 'vegan' package (adonis2 function; Oksanen *et al.*, 2018) for PERMANOVAs and the 'MASS' package (lda function; Venables & Ripley, 2002) for the LDAs.

RESULTS

A total of 82 chemical compounds were detected in scent samples from 154 individuals (mean ± SD, 30.96 ± 5.17 compounds per individual). We found that the chemical composition of the anal gland secretion

of Alpine marmots contained a mixture of small volatile and large non-volatile chemical compounds, from piperidin-2-one (molecular weight, 99.13 g mol⁻¹) to lanosterol (molecular weight, 426.71 g mol⁻¹).

SCENT OF SEXUAL MATURITY STATUS

The PERMANOVA performed on the whole data set indicated a difference between sexually mature individuals and immature ones (pseudo-F $F_{1,150} = 80.68$, $P = 0.0001$), but neither the sex effect (pseudo-F $F_{1,150} = 1.34$, $P = 0.22$) nor the interaction between sex and sexual maturity status (pseudo-F $F_{1,150} = 1.15$, $P = 0.28$) was significant. The principal components analysis led us to select 24 chemical compounds for the subsequent analyses (Table 2), which had a global contribution to the first three axes > 50%. The PERMANOVA performed on those 24 compounds gave similar results to the one performed on the whole data

set (sexual maturity status, pseudo-F $F_{1,150} = 117.10$, $P = 0.0001$; sex, pseudo-F $F_{1,150} = 1.10$, $P = 0.30$; and interaction, pseudo-F $F_{1,150} = 1.11$, $P = 0.29$), indicating that no important chemical information was lost using our procedure of compound selection.

The LDA performed well at separating sexually mature from immature individuals on the basis of these 24 compounds (Fig. 1), correctly assigning 95.60% of sexually mature individuals and 96.83% of immature individuals. Five compounds characterized sexually mature individuals, whereas eight other compounds were strongly characteristic of immature individuals (Table 2). Specifically, the anal gland secretions of sexually mature individuals appeared to be characterized by a high relative abundance of various chemical families, such as alkaloid (piperidin-2-one), carboxylic acid (3-phenylpropanoic acid), lactone (5-dodecyloxolan-2-one) and steroids (cholestanol and cholest-5-en-3-one). In contrast, anal gland secretions of immature

Table 2. Chemical compounds retained in the linear discriminant analysis to separate individuals according to sexual maturity status

Number of compound	Retention time (min)	RI calculated	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Name of compound proposed	Formula	Cos
1	7.075	—	99	Piperidin-2-one	C ₅ H ₉ NO	0.72*†
2	9.251	1328	150	3-Phenylpropanoic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.68*†
3	11.9	1558	200	Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	-0.52*‡
4	13.542	1720	226	Pentadecanal	C ₁₅ H ₃₀ O	0.43
5	13.72	1739	226	(Z)-9-Tetradecenoic acid	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	-0.44
6	13.886	1757	228	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	-0.76*‡
7	14.499	1821	240	Hexadecanal	C ₁₆ H ₃₂ O	0.44
8	14.566	1827	234	Bakkenolide A	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	-0.42
9	14.846	1856	242	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	-0.33
10	15.512	1922	—	Hexadecenoic acid derivative	C ₁₆ H ₃₄ O ₂	-0.24
11	15.704	1940	254	9-Hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	-0.55*‡
12	15.914	1959	256	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-0.73*‡
13	16.702	2030	—	Heptadecanoic acid derivative	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-0.39
14	17.023	2058	270	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-0.49
15	17.615	2108	254	5-Dodecyloxolan-2-one	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	0.87*†
16	17.973	2137	—	Octadecenoic acid derivative	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-0.70*‡
17	18.268	2161	284	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-0.74*‡
18	20.343	2321	—	Ethyl linoleate derivative	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	-0.37
19	20.902	2362	312	Eicosanoic acid	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	-0.58*‡
20	27.093	2813	410	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	-0.73*‡
21	27.814	2867	368	Cholesta-2,4-diene	C ₂₇ H ₄₄	0.48
22	31.125	3123	386	Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	-0.18
23	31.208	3130	388	Cholestanol	C ₂₇ H ₄₈ O	0.88*†
24	32.513	3236	384	Cholest-5-en-3-one	C ₂₇ H ₄₄ O	0.62*†

Abbreviations: Cos, cosines between the 24 compounds and the first axe of the linear discriminant analysis (proxy of the contribution to the discriminant function); and RI calculated, Kovats' retention index calculated using a mixture of C₇–C₄₀ alkanes with known RIs. *Compounds having a cosine > 0.5 (as an absolute value). †Compounds characterized sexually mature individuals. ‡Compounds characterized immature individuals.

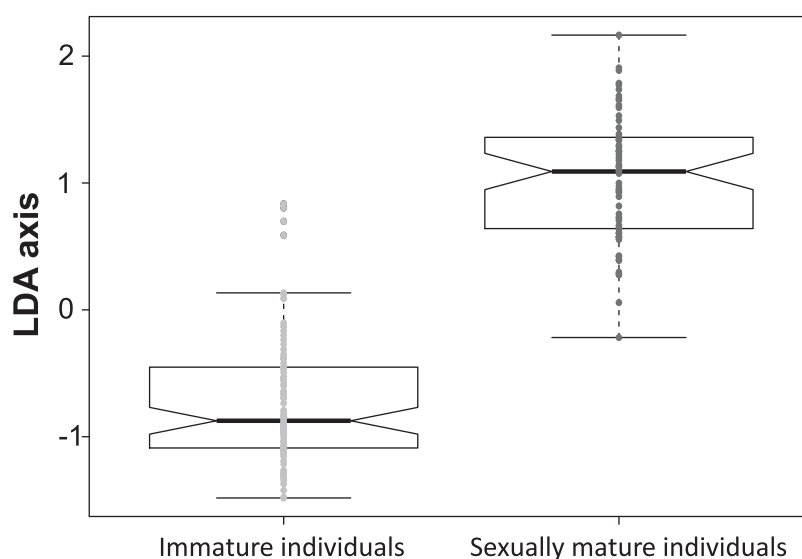


Figure 1. Box-plot of the score on the axis of the linear discriminant analysis (LDA) separating immature (light grey circles) from sexually mature individuals (dark grey circles).

individuals were relatively rich in fatty acids (e.g. dodecanoic acid, tetradecanoic acid, 9-hexadecanoic acid, hexadecanoic acid, octadecenoic acid derivative, octadecanoic acid and eicosanoic acid). They also presented a high relative abundance of a triterpene (squalene).

SCENT INFORMS ON SEX AND SOCIAL STATUS IN ADULT INDIVIDUALS

Of the 82 chemical compounds, 16 disappeared or were found in < 5% of sexually mature individuals. The PERMANOVA performed on the remaining 66 chemical compounds indicated a difference between social status (pseudo- $F_{1,59} = 4.58$, $P = 0.003$), but not between sexes (pseudo- $F_{1,59} = 1.90$, $P = 0.096$), and a significant interaction between sex and social status (pseudo- $F_{1,59} = 3.23$, $P = 0.02$). Of the 24 selected chemical compounds, five disappeared or were found in < 5% of sexually mature individuals [dodecanoic acid, (Z)-9-tetradecenoic acid, bakkenolide A, heptadecanoic acid derivative and ethyl linoleate derivative; Table 2]. The PERMANOVA performed on the 19 remaining compounds gave similar results to the one performed on the 66 compounds (social status, pseudo- $F_{1,59} = 6.11$, $P = 0.031$; sex, pseudo- $F_{1,59} = 1.58$, $P = 0.18$; and interaction, pseudo- $F_{1,59} = 3.48$, $P = 0.032$), indicating that no chemical information was lost using our procedure for compound selection.

The first two axes of the LDA performed on the 19 compounds separated adult individuals according to sex and social status well (Fig. 2). The first axis clearly opposed subordinate individuals and dominant individuals, whereas the second axis clearly opposed females and males. The LDA correctly assigned 87.50%

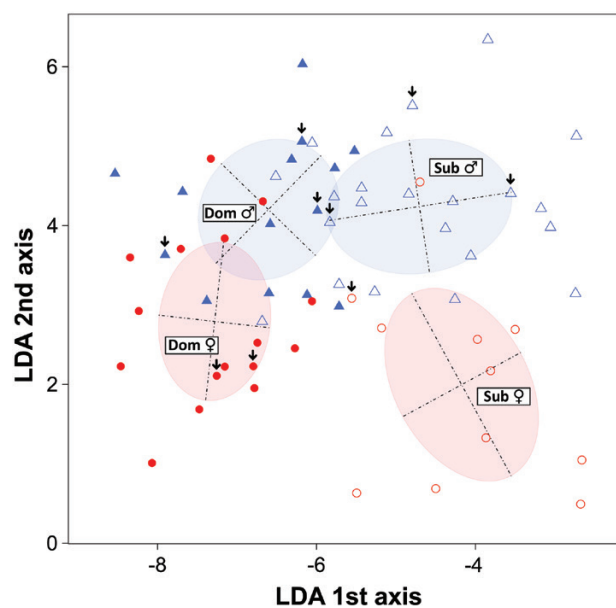


Figure 2. First factorial map of the linear discriminant analysis (LDA) separating adult individuals according to sex and social status. Sex: males are represented by blue triangles and females by red circles. Social status: dominant (Dom) individuals are represented by filled symbols and subordinate (Sub) individuals by open symbols. Three-year-old individuals ($N = 9$) are identified with an arrow.

of dominant females (only two dominant females were misclassified as dominant males) and 72.73% of subordinate females (three subordinate females were misclassified as subordinate males). In males, the LDA correctly assigned subordinate individuals much better than dominant individuals (90.91% and 64.29%,

respectively). Two dominant males were misclassified as dominant females, and three of them were misclassified as subordinate males, whereas only two subordinate males were misclassified, as a dominant male and a female. We found that anal gland secretions of sexually mature female Alpine marmots were relatively rich in fatty acids, piperidin-2-one (alkaloid) and cholestanol (steroid) compared with male individuals. Anal gland secretions of male Alpine marmots were instead relatively rich in hexadecenoic acid derivative (fatty acid), pentadecanal and hexadecanal (aldehydes), squalene (triterpene), cholesterol (steroid) and 3-phenylpropanoic acid (carboxylic acid) (Fig. 3). Furthermore, anal gland secretions of subordinate male Alpine marmots were relatively rich in cholesterol (steroid) and 3-phenylpropanoic acid (carboxylic acid) compared with dominant male individuals. Conversely, anal gland secretions of dominant female Alpine marmots were relatively rich in cholestanol (steroid) and pentadecanoic acid (fatty acid). One lactone (5-dodecyloxonan-2-one) seems to characterize dominant individuals, regardless of their sex (Fig. 3).

DISCUSSION

Our results indicated that the chemical composition of anal gland secretions strongly differed between sexually mature and immature Alpine marmots. When

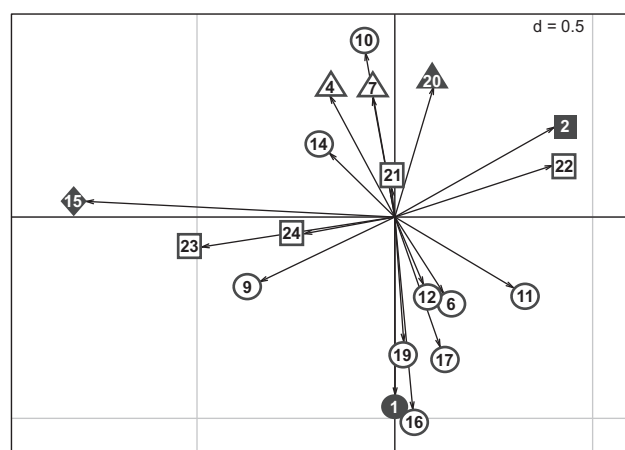


Figure 3. Graphical representation of the cosines between the 19 compounds and the first two axes of the linear discriminant analysis separating adult individuals according to sex and social status. Each number represents a specific compound (see Table 2 for the corresponding compounds). Each symbol represents a chemical family: alkaloid (1; filled circle), carboxylic acid (2; filled square), fatty acids (6, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 19; open circles), aldehydes (4, 7; open triangles), lactone (15; filled diamond), triterpene (20; filled triangle) and steroids (21, 22, 23, 24; open squares).

considering only adult Alpine marmots, our results also indicated that the chemical composition of anal gland secretions differed according to sex and social status.

SCENT OF SEXUAL MATURATION

We expected that the chemical composition of anal gland secretions would change after sexual maturity. This expectation was validated in the Alpine marmot. A change in scent chemical composition with sexual maturation has previously been reported in a variety of mammals (e.g. Asian elephants, *Elephas maximus*: Rasmussen *et al.*, 2002; giant pandas, *Ailuropoda melanoleuca*: Yuan *et al.*, 2004; owl monkeys, *Aotus nancymae* and *Aotus* spp.: MacDonald *et al.*, 2008; Spence-Aizenberg *et al.*, 2018; mandrills, *Mandrillus sphinx*: Setchell *et al.*, 2010; Vaglio *et al.*, 2016; and greater sac-winged bats, *Saccolpteryx bilineata*: Caspers *et al.*, 2011). Furthermore, Osada *et al.* (2009) have demonstrated that the composition of the urine of adult and prepubescent male rats differs significantly in the presence of a few specific compounds, and female rats are more attracted to the odour of adult males than that of prepubescent males, suggesting that the chemical composition of the urine of male rats is used by female rats to gain information about sexual maturity.

These differences in the chemical composition of anal gland scents between sexually mature and immature individuals might have several non-exclusive explanations. First, it is likely that these differences are a consequence of developmental processes. For example, these differences might reflect hormonal changes as individuals reach sexual maturity. Indeed, in many mammals, individuals reaching puberty show some modification of androgen concentrations (e.g. primates: Saltzman *et al.*, 2011; giraffes, *Giraffa camelopardalis*: Wolf *et al.*, 2018). Regarding testosterone, some testosterone-dependent volatile compounds found in the urine of male mice (*Mus musculus*; Novotny *et al.*, 1985) may modify male attractiveness, suggesting modification of the chemical composition by levels of testosterone (Jemiolo *et al.*, 1985). It is also possible that these differences are the consequence of other maturation processes. For example, these differences might be explained by a change in diet with age (Hagey *et al.*, 1997; Kwak *et al.*, 2008; Schaefer *et al.*, 2010). The diet of Alpine marmots is mainly composed of leaves and flowers, particularly of dicots (Massemmin *et al.*, 1996; Garin *et al.*, 2008), but whether the diet changes with age is yet to be documented in the Alpine marmot. Finally, this could also be explained by modifications of anal gland microbial flora with ageing (e.g. van Dongen *et al.*, 2013; Leclaire *et al.*, 2014). Second, the scent of sexually mature individuals might signal to adults of the opposite sex that they are potential mates (Johansson & Jones, 2007) and to

same-sex adults that they are potential competitors (Ralls, 1971; Brown 1979; Gosling & Roberts, 2001). A change of scent chemical composition as individuals mature might also be a way for immature individuals to avoid aggression by dominant individuals, which may focus their aggression towards direct competitors (Rasmussen *et al.*, 2002).

SEX EFFECT

We expected that the chemical composition from anal gland secretions would differ between sexes. We found such a sex difference, but only in adult individuals; a result also found in mandrills (Setchell *et al.*, 2010). We found that the anal gland secretions of adult female Alpine marmots were relatively rich in cholestanol compared with adult male individuals, which was likewise found in anogenital gland secretions of female giant pandas (Yuan *et al.*, 2004). The anal gland secretions of adult male Alpine marmots were instead relatively rich in pentadecanal, and this compound has also been reported to be relatively more abundant in male than in female adult giant pandas (Yuan *et al.*, 2004).

Our results indicate that the chemical composition of anal gland scent might be used for sex recognition in the Alpine marmot. The ability of scent secretions to inform on sex is well documented in both eutherian mammals (e.g. hyena, *Crocuta crocuta*: Drea *et al.*, 2002; ring-tailed lemurs, *Lemur catta*: Hayes *et al.*, 2004; Scordato *et al.*, 2007; owl monkeys: MacDonald *et al.*, 2008; Eurasian otters, *Lutra lutra*: Kean *et al.*, 2011; brown bears, *Ursus arctos*: Rosell *et al.*, 2011; giant pandas: Yuan *et al.*, 2004) and monotremes (e.g. short-beaked echidna, *Tachyglossus aculeatus*: Harris *et al.*, 2012, 2014). Classically, sex recognition from olfactory cues has been suggested to play a role in sexual interactions such as mate location (Alberts, 1992), mate attraction (Haymann, 2006) and mate choice (Johansson & Jones, 2007). Furthermore, Alpine marmots are not sexually dimorphic in size and colour pattern; therefore, a sex-specific chemical scent might play an important role in sex recognition in this sexually monomorphic species. We cannot discard these hypotheses, but our results also support the prediction that sex recognition from olfactory cues might allow sexually mature individuals to target same-sex competitors during competitive interactions. In the Alpine marmot, intrasexual competition for dominant status still occurs after the mating season, with dominant individuals often being challenged and evicted during the whole of the active period. Accordingly, we found sex differences in anal gland secretions sampled after the mating season. More information is needed, however, to ascertain whether sex recognition from olfactory cues plays a role in intrasexual competition in the Alpine marmot.

SOCIAL STATUS EFFECT

We expected that the chemical composition of anal gland secretions would differ between dominant and subordinate individuals. This expectation was validated in the Alpine marmot, suggesting that the chemical composition of anal gland secretions might convey information on social status in both sexes in the Alpine marmot. This result was consistent with other studies in mammals (e.g. Hayes *et al.*, 2002; Burgener *et al.*, 2009; Setchell *et al.*, 2010).

This social status signature in Alpine marmot anal gland secretions might be attributable, in part, to social status being confounded with age in our samples. Indeed, the majority of subordinate individuals were 2 years old, whereas all dominant individuals were 3–12 years old. However, both dominant ($N = 5$) and subordinate ($N = 4$) individuals were found among 3-year-old individuals. Three-year-old dominant individuals had chemical profiles corresponding to that of older dominants, whereas 3-year-old subordinate individuals had chemical profiles that corresponded to that of 2-year-old subordinate individuals. Although the number of 3-year-old individuals was small, these results suggest that it is unlikely that the differences we found in chemical composition of anal gland secretions between dominant and subordinate individuals were attributable to an age effect alone.

Instead, we believe that these differences result from the outcome of intrasexual competition in Alpine marmots. Indeed, the competition for dominant status occurring between same-sex individuals within family groups of cooperative breeders results in the dominant individual suppressing the reproduction of non-evicted subordinate individuals. In Alpine marmots, there is a clear role of aggression by dominant individuals in the reproductive suppression of same-sex subordinate individuals (Arnold & Dittami, 1997; Hackländer *et al.*, 2003), whereas direct suppression through olfactory cues, as in other cooperative breeder species (e.g. inhibition of ovulation in daughters in cooperatively breeding primates; Ziegler, 2013), has not been evidenced. Aggression by dominant individuals results in high rates of stress hormones (e.g. corticosteroids), which in turn leads to low levels of testosterone in subordinate males and low levels of progesterone in subordinate females (Arnold & Dittami, 1997; Hackländer *et al.*, 2003). These physiological consequences of subordinate reproductive suppression may thus explain the differences in chemical composition we found between subordinate and dominant individuals of both sexes. However, reproductive suppression is not complete in subordinate males, which can sometimes gain extra-pair paternities (Goossens *et al.*, 1998; Cohan *et al.*, 2006). This incomplete reproductive suppression in male subordinates might explain the significant interaction between sex and social status in

PERMANOVAs and may thus explain why the difference in chemical composition of anal gland secretions between dominant and subordinate individuals was more pronounced in females than in males.

The differences in anal gland scent profiles between dominant and subordinate Alpine marmots might reduce overt conflicts among same-sex group adults, as suggested in other species (e.g. owl monkeys: MacDonald *et al.*, 2008). The scent of subordinate Alpine marmots might carry a non-threatening message to dominant individuals, which might then refrain from aggression. Likewise, field observations indicated that subordinate Alpine marmots often avoided coming too close to the same-sex dominant individuals; an avoidance also described in other species (e.g. Asian elephants; Rasmussen *et al.*, 2002).

CONCLUSION

Our results suggest that olfactory cues may serve in intrasexual competition in the Alpine marmot by informing others of sexual maturity, sex and dominance status. Our study supports the hypothesis that a change of scent chemical composition as individuals mature and become dominant could be a way in which to regulate the conflict (in both sexes) over access to dominance (and therefore reproduction) in cooperative breeders. Dominant individuals direct their aggressiveness towards individuals that represent the major threat and suppress the reproduction of subordinates (Young, 2009; Clutton-Brock & Huchard, 2013). However, to validate our conclusions, future behavioural experiments should investigate the response of individuals to the odour of conspecifics differing in sexual maturity, sex and social status.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Sarah Leclaire for helpful discussions and comments on the manuscript. We also thank Sylvia Pardonnet and all students involved in the trapping of marmots for helping us in the field and supporting us during the collection of scent samples. Thanks also to the Vanoise National Park for allowing us to work in the Grande Sassi re nature reserve. We warmly thank Simon Chapman for editing the English. We also want to thank the three anonymous reviewers for their constructive comments on an earlier version of the manuscript.

REFERENCES

- Alberts AC. 1992. Constraints on the design of chemical communication systems in terrestrial vertebrates. *The American Naturalist* **139**: S62–S69.
- Allainé D. 2000. Sociality, mating system and reproductive skew in marmots: evidence and hypotheses. *Behavioural Processes* **51**: 21–34.
- Allainé D, Brondex F, Graziani L, Coulon J, Till-Bottraud I. 2000. Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behavioral Ecology* **11**: 507–514.
- Anderson MJ. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**: 32–46.
- Anderson MJ. 2017. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). In: Balakrishnan N, Colton T, Everitt B, Piegorsch W, Ruggeri F, Teugels JL, eds. *Wiley statsref: statistics reference online*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 1–15.
- Armitage KB. 2014. *Marmot biology: sociality, individual fitness, and population dynamics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Arnold W. 1990. The evolution of marmot sociality: I. Why disperse late? *Behavioral ecology and Sociobiology* **27**: 229–237.
- Arnold W, Dittami J. 1997. Reproductive suppression in male Alpine marmots. *Animal Behaviour* **53**: 53–66.
- Bell MBV, Nichols HJ, Gilchrist JS, Cant MA, Hodge SJ. 2012. The cost of dominance: suppressing subordinate reproduction affects the reproductive success of dominant female banded mongooses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 619–624.
- Bel MC, Coulon J, Sreng L, Allainé D, Bagnères AG, Clément JL. 1999. Social signals involved in scent-marking behavior by cheek-rubbing in Alpine marmots (*Marmota marmota*). *Journal of Chemical Ecology* **25**: 2267–2293.
- Bel MC, Porteret C, Coulon J. 1995. Scent deposition by cheek rubbing in the alpine marmot (*Marmota marmota*) in the French Alps. *Canadian Journal of Zoology* **73**: 2065–2071.
- Bretman A, Westmancoat JD, Gage MJG, Chapan T. 2011. Males use multiple, redundant cues to detect mating rivals. *Current Biology* **21**: 617–622.
- Brown RE. 1979. Mammalian social odors: a critical review. *Advances in Study of Behavior* **10**: 103–162.
- Buesching CD, Waterhouse JS, Macdonald DW. 2002. Gas-chromatographic analyses of the subcaudal gland secretion of the European badger (*Meles meles*) part II: time-related variation in the individual-specific composition. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 57–69.
- Burgener N, Dehnhard M, Hofer H, East ML. 2009. Does anal gland scent signal identity in the spotted hyaena? *Animal Behaviour* **77**: 707–715.
- Candolin U. 2003. The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **78**: 575–595.
- Cant MA, Hodge SJ, Bell MBV, Gilchrist JS, Nicols HJ. 2010. Reproductive control via eviction (but not the threat of eviction) in banded mongooses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 2219–2226.
- Cant MA, Johnstone RA. 2009. How threats influence the evolutionary resolution of within-group conflict. *The American Naturalist* **173**: 759–771.
- Casper BA, Schroeder FC, Franke S, Voigt CC. 2011. Scents of adolescence: the maturation of the olfactory

- phenotype in a free-ranging mammal (T Burne, Ed.). *PLoS ONE* **6**: e21162.
- Clarke KR, Warwick RM. 2001. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Plymouth: Primer-e Ltd.
- Clutton-Brock T. 2009. Cooperation between non-kin in animal societies. *Nature* **462**: 51–57.
- Clutton-Brock TH, Brotherton PNM, Smith R, McIlrath GM, Kansky R, Gaynor D, O'Riain MJ, Skinner JD. 1998. Infanticide and expulsion of females in a cooperative mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **265**: 2291–2295.
- Clutton-Brock TH, Hodge SJ, Spong G, Russell AF, Jordan NR, Bennett NC, Sharpe LL, Manser MB. 2006. Intrasexual competition and sexual selection in cooperative mammals. *Nature* **444**: 21–28.
- Clutton-Brock TH, Huchard E. 2013. Social competition and selection in males and females. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **368**: 20130074.
- Cohas A, Yoccoz NG, Da Silva A, Goossens B, Allainé D. 2006. Extra-pair paternity in the monogamous alpine marmot (*Marmota marmota*): the roles of social setting and female mate choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59**: 597–605.
- delBarco-Trillo J, Burkert BA, Goodwin TE, Drea CM. 2011. Night and day: the comparative study of strepsirrhine primates reveals socioecological and phylogenetic patterns in olfactory signals. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 82–98.
- delBarco-Trillo J, Sacha CR, Dubay GR, Drea CM. 2012. *Eulemur*, me lemur: the evolution of scent-signal complexity in a primate clade. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **367**: 1909–1922.
- Dobson FS. 1982. Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. *Animal Behaviour* **30**: 1183–1192.
- van Dongen WF, White J, Brandl HB, Moodley Y, Merklung T, Leclaire S, Blanchard P, Danchin E, Hatch SA, Wagner RH. 2013. Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BMC Ecology* **13**: 11.
- Dray S, Dufour AB. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**: 1–20.
- Drea CM, Boulet M, Delbarco-Trillo J, Greene LK, Sacha CR, Goodwin TE, Dubay GR. 2013. The “secret” in secretions: methodological considerations in deciphering primate olfactory communication. *American Journal of Primatology* **75**: 621–642.
- Drea CM, Vignieri SN, Kim HS, Weldele ML, Glickman SE. 2002. Responses to olfactory stimuli in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*): II. Discrimination of conspecific scent. *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)* **116**: 342–349.
- Garin I, Aldezabal A, Herrero J, García-Serrano A, Remón JL. 2008. Diet selection of the Alpine marmot (*Marmota m. marmota* L.) in the Pyrenees. *Revue d'Écologie (Terre et Vie)* **63**: 383–390.
- Goossens B, Graziani L, Waits LP, Farand E, Magnolon S, Coulon J, Bel MC, Taberlet P, Allainé D. 1998. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **43**: 281–288.
- Gosling LM, Roberts SC. 2001. Scent-marking by male mammals: cheat-proof signals to competitors and mates. *Advances in the Study of Behavior* **30**: 169–217.
- Hackländer K, Möstl E, Arnold W. 2003. Reproductive suppression in female Alpine marmots, *Marmota marmota*. *Animal Behaviour* **65**: 1133–1140.
- Hagey LR, Gavrilkina MA, Hofmann AF. 1997. Age-related changes in the biliary bile acid composition of bovids. *Canadian Journal of Zoology* **75**: 1193–1201.
- Harris RL, Davies NW, Nicol SC. 2012. Chemical composition of odorous secretions in the Tasmanian short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus setosus*). *Chemical Senses* **37**: 819–836.
- Harris RL, Holland BR, Cameron EZ, Davies NW, Nicol SC. 2014. Chemical signals in the echidna: differences between seasons, sexes, individuals and gland types. *Journal of Zoology* **293**: 171–180.
- Hauber ME, Lacey EA. 2005. Bateman's principle in cooperatively breeding vertebrates: the effects of non-breeding alloparents on variability in female and male reproductive success. *Integrative and Comparative Biology* **45**: 903–914.
- Hayes RA, Morelli TL, Wright PC. 2004. Anogenital gland secretions of *Lemur catta* and *Propithecus verreauxi coquereli*: a preliminary chemical examination. *American Journal of Primatology* **63**: 49–62.
- Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG. 2002. Semiochemicals and social signaling in the wild European rabbit in Australia: I. Scent profiles of chin gland secretion from the field. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 363–384.
- Haymann EW. 2006. Scent-marking strategies of New World primates. *American Journal of Primatology* **68**: 650–661.
- Jemiolo B, Alberts J, Sochinski-Wiggins S, Harvey S, Novotny M. 1985. Behavioural and endocrine responses of female mice to synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Animal Behaviour* **33**: 1114–1118.
- Johansson BG, Jones TM. 2007. The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **82**: 265–289.
- Johnstone RA, Cant MA. 1999. Reproductive skew and the threat of eviction: a new perspective. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **266**: 275–279.
- Kean EF, Müller CT, Chadwick EA. 2011. Otter scent signals age, sex, and reproductive status. *Chemical Senses* **36**: 555–564.
- Kwak J, Willse A, Matsumura K, Curran Opiekun M, Yi W, Preti G, Yamazaki K, Beauchamp GK. 2008. Genetically-based olfactory signatures persist despite dietary variation. *PLoS ONE* **3**: e3591.
- Leclaire S, Nielsen JF, Drea CM. 2014. Bacterial communities in meerkat anal scent secretions vary with host sex, age, and group membership. *Behavioral Ecology* **25**: 996–1004.
- Linklater WL, Mayer K, Swaisgood RR. 2013. Chemical signals of age, sex and identity in black rhinoceros. *Animal Behaviour* **85**: 671–677.

- Macdonald EA, Fernandez-Duque E, Evans S, Hagey LR. 2008.** Sex, age, and family differences in the chemical composition of owl monkey (*Aotus nancymae*) subcaudal scent secretions. *American Journal of Primatology* **70**: 12–18.
- Magrath WD, Johnstone RA, Heinsohn RG. 2004.** Reproductive skew. In: Koenig WD, Dickinson JL, eds. *Ecology and evolution of cooperative breeding in birds*. Cambridge: Cambridge University Press, 157–176.
- Martín J, Carranza J, López P, Alarcos S, Pérez-González J. 2014.** A new sexual signal in rutting male red deer: age related chemical scent constituents in the belly black spot. *Mammalian Biology* **79**: 362–368.
- Massemin S, Gibault C, Ramousse R, Butet A. 1996.** Premières données sur le régime alimentaire de la marmotte alpine (*Marmota marmota*) en France. *Mammalia* **60**: 351–361.
- Novotny M, Harvey S, Jemioło B, Alberts J. 1985.** Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 2059–2061.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2018.** *vegan: community ecology package. R package version 2.4–6*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed 06 August 2018).
- Osada K, Kashiwayanagi M, Izumi H. 2009.** Profiles of volatiles in male rat urine: the effect of puberty on the female attraction. *Chemical Senses* **34**: 713–721.
- Psenner H. 1957.** Neues vom Murmeltier, *Marmota m. marmota* (Linné 1758). *Säugetierkundliche Mitteilungen* **5**: 4–10.
- Psenner H. 1960.** Das Verhalten der Murmeltiere (*Marmota m. marmota*), ins besondere von Mutter und Jungen. *Säugetierkundliche Mitteilungen* **8**: 144–148.
- R Core Team. 2017.** *R: a language and environment for statistical computing*. Available at: <https://www.R-project.org/> (accessed 06 August 2018).
- Ralls K. 1971.** Mammalian scent marking. *Science* **171**: 443–449.
- Rasmussen LEL, Riddle HS, Krishnamurthy V. 2002.** Mellifluous matures to malodorous in musth. *Nature* **415**: 975–976.
- Rosell F, Jojola SM, Ingdal K, Lassen BA, Swenson JE, Arnemo JM, Zedrosser A. 2011.** Brown bears possess anal sacs and secretions may code for sex. *Journal of Zoology* **283**: 143–152.
- Saltzman W, Liedl KJ, Salper OJ, Pick RR, Abbott DH. 2008.** Post-conception reproductive competition in cooperatively breeding common marmosets. *Hormones and Behavior* **53**: 274–286.
- Saltzman W, Tardif SD, Rutherford JN. 2011.** Hormones and reproductive cycles in primates. In: Norris DO, Lopez KH, eds. *Hormones and reproduction of vertebrates*. Academic Press, 291–327.
- Schaefer ML, Wongravee K, Holmboe ME, Heinrich NM, Dixon SJ, Zeskind JE, Kulaga HM, Brereton RG, Reed RR, Trevejo JM. 2010.** Mouse urinary biomarkers provide signatures of maturation, diet, stress level, and diurnal rhythm. *Chemical Senses* **35**: 459–471.
- Scordato ES, Dubay G, Drea CM. 2007.** Chemical composition of scent marks in the ringtailed lemur (*Lemur catta*): glandular differences, seasonal variation, and individual signatures. *Chemical Senses* **32**: 493–504.
- Setchell JM, Vaglio S, Moggi-Cecchi J, Boscaro F, Calamai L, Knapp LA. 2010.** Chemical composition of scent-gland secretions in an old world monkey (*Mandrillus sphinx*): influence of sex, male status, and individual identity. *Chemical Senses* **35**: 205–220.
- Siberchicot A, Julien-Laferrrière A, Dufour AB, Thioulouse J. 2017.** *adegraphics: an S4 lattice-based package for the representation of multivariate data. R package version 1.0-9*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=adegraphics> (accessed 06 August 2018).
- Silk JB. 2007.** The adaptive value of sociality in mammalian groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **362**: 539–559.
- Spence-Aizenberg A, Kimball BA, Williams LE, Fernandez-Duque E. 2018.** Chemical composition of glandular secretions from a pair-living monogamous primate: sex, age, and gland differences in captive and wild owl monkeys (*Aotus* spp.). *American Journal of Primatology* **80**: e22730.
- Tinnesand HV, Jojola S, Zedrosser A, Rosell F. 2013.** The smell of desperadoes? Beavers distinguish between dominant and subordinate intruders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **67**: 895–904.
- Vaglio S, Minicozzi P, Romoli R, Boscaro F, Pieraccini G, Moneti G, Moggi-Cecchi J. 2016.** Sternal gland scent-marking signals sex, age, rank, and group identity in captive mandrills. *Chemical Senses* **41**: 177–186.
- Venables WN, Ripley BD. 2002.** *Modern applied statistics with S*. New York: Springer.
- Wolf TE, Schaebs FS, Bennett NC, Burroughs R, Ganswindt A. 2018.** Age and socially related changes in fecal androgen metabolite concentrations in free-ranging male giraffes. *General and Comparative Endocrinology* **255**: 19–25.
- Wyatt TD. 2014.** *Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Young AJ. 2009.** The causes of physiological suppression in vertebrate societies: a synthesis. In: Hager R, Jones CB, eds. *Reproductive skew in vertebrates: proximate and ultimate causes*. Cambridge: Cambridge University Press, 397–436.
- Yuan H, Liu D, Sun L, Wei R, Zhang G, Sun R. 2004.** Anogenital gland secretions code for sex and age in the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*. *Canadian Journal of Zoology* **82**: 1596–1604.
- Zabaras R, Richardson BJ, Wyllie SG. 2005.** Evolution in the suite of semiochemicals secreted by the sternal gland of Australian marsupials. *Australian Journal of Zoology* **53**: 257–263.
- Ziegler TE. 2013.** Social effects via olfactory sensory stimuli on reproductive function and dysfunction in cooperative breeding marmosets and tamarins. *American Journal of Primatology* **75**: 202–211.

ANNEXE 3

Test de la discrimination entre un individu familial vs un individu non-familier étranger

Collecte des échantillons odorants

Pour l'ensemble des marmottes capturées en 2017 et 2018 nous avons récoltés des échantillons de sécrétions des glandes anales et buccales à l'aide de lingettes (dimensions : (15*25)/6 cm, SZMRT JAVISA 300, Textil-2000 Kft, Győr, Hungary). Ces lingettes, utilisées par la police scientifique française, sont idéales pour capter et retenir les composés chimiques. Après avoir nettoyé les glandes anales et buccales à l'éthanol pour éliminer tout éventuel contaminant, celles-ci ont été légèrement pressées manuellement afin d'en faire sortir une petite quantité de sécrétion odorante. Le manipulateur portait des gants en nitrile afin d'éviter de contaminer les échantillons. Pour prélever les sécrétions, 4 lingettes par individu ont été frottées sur les glandes anales et 4 autres sur la glande buccale. Chaque paquet de 4 lingettes a ensuite été stocké dans un sac en Nalophan™, qui est une matière qui n'émet aucun composé chimique, et stocké à température ambiante (environ 5°C) jusqu'au début de l'expérience. Cette méthode de stockage (i.e. lingettes couplées à un stockage dans des sacs en Nalophan™) nous a permis de conserver les échantillons tout le long de la saison de terrain.

Dispositif expérimental

Nous avons réalisé des tests de choix binaires en utilisant deux piquets en métal sur lesquels nous avons placé des tubes métalliques positionnés à environ 50 cm l'un de l'autre (pour permettre aux marmottes de les différencier), et à environ 50 cm de l'entrée principale du terrier (afin de maximiser les chances d'être sentis par les marmottes : **Fig.32**). Deux piquets ont été placés sur chaque territoire au début de la saison de terrain pour éviter les réactions comportementales liées à l'introduction d'un objet étranger sur le territoire pendant l'expérience. Les piquets ont ensuite été remplacés par les tubes métalliques expérimentaux sur lesquels nous avons fixé les lingettes à l'aide d'aimants magnétiques (**Fig.32**).

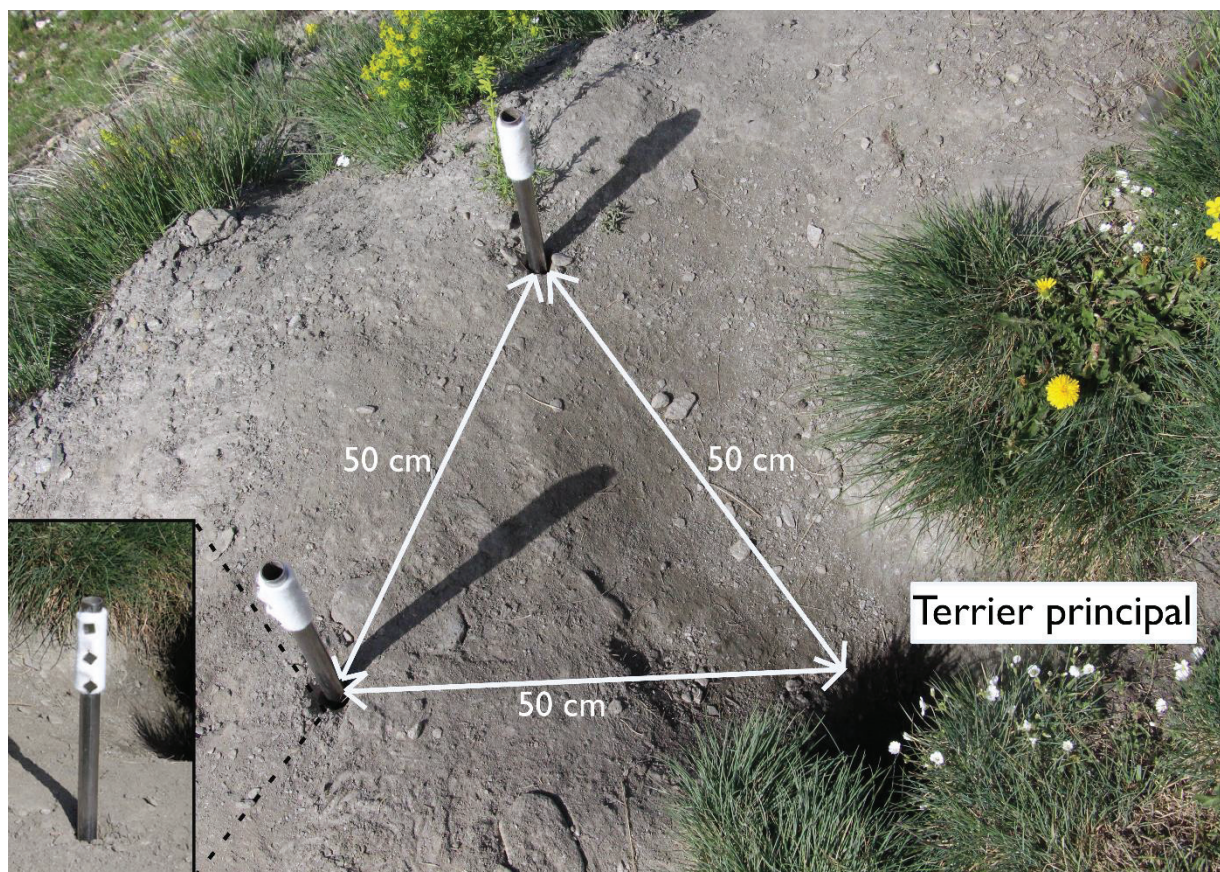


Figure 1 : Photographie du dispositif expérimental du test de choix binaire « familier vs non-familier ». Photographie personnelle

Procédure générale

Toutes les expériences comportementales ont été réalisées de mi-Mai à mi-Juillet (2017 et 2018) de 7h00 à 19h00, c'est-à-dire au moment du pic d'activité des marmottes. Pour chaque essai, les odeurs utilisées ont été attribuées à l'un ou l'autre tube métallique de manière aléatoire. Les individus focaux n'ont jamais été testés deux fois avec les mêmes odeurs (i.e. pas de pseudo-réplication). Une fois les tubes installés, l'expérimentateur s'est placé en dehors du territoire focal afin de ne pas déranger les marmottes. L'expérience a donc été observée de loin avec des jumelles 10 x 42 et/ou des longues-vues 20 x 60, afin d'identifier les individus interagissant avec les lingettes, mais également leur comportement (marquage et/ou reniflement de la lingette). Une fois qu'un individu du groupe social focal était suffisamment près du dispositif expérimental, l'expérimentateur a enregistré l'expérience à l'aide d'une caméra numérique (Sony® Handycam modèle DCR-DVD650 ou JVC® modèle vidéo numérique GZ-E209). L'essai était considéré

comme un succès si n'importe quel individu membre du groupe focal reniflait et/ou marquait au moins une fois l'une des deux lingettes, et ce dans l'heure qui suivait le début de l'expérience, mais été considéré comme un échec si rien ne se passait dans ce temps imparti. Une fois qu'un individu reniflait et/ou marquait l'une des deux lingettes, l'expérience continuait pendant encore 30 minutes mais s'arrêtait si un autre individu venait interagir avec le dispositif expérimental.

