

Étude préliminaire de la communication chimique chez la marmotte alpine

(*Marmota marmota*)

Olivier Bastianelli, L3 Biosciences, ENS de Lyon

INTRODUCTION

Depuis 1990, le Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE) de l'université Lyon 1 mène une étude sur la marmotte alpine : le Projet Marmotte Alpine. Ce projet permet avant tout de réaliser de multiples études utilisant la marmotte alpine comme modèle puisqu'il fournit de nombreuses données relatives à la population étudiée chaque été en Vanoise (réserve de la Grande Sassière) depuis sa création.

Mon stage s'inscrit dans le projet en étudiant deux aspects de la communication chimique chez la marmotte alpine, mon travail a donc été séparé en deux recherches distinctes sur cette communication chimique.

Le premier volet concerne le choix du partenaire chez la marmotte alpine. La marmotte alpine est une mammifère fouisseur social. Elle vit en groupes familiaux qui occupent chacun un territoire. Chaque territoire et donc chaque groupe n'a qu'un couple reproducteur dominant, les autres membres de la familles sont des subordonnés, même si 37% des portées contiendraient des jeunes issus de paternités hors-couple (Cohas & al, 2006). De plus le choix des nouveaux partenaires par la femelle dominante n'est pas laissé au hasard : les femelles auraient tendance à rechercher un bénéfice génétique (hétérozygotie, distance génétique) en choisissant des partenaires différents (Cohas & al, 2007).

Ce résultat soulève donc la question de savoir comment la femelle peut faire son choix et de quelles informations elle dispose pour le faire. On émet l'hypothèse que la communication chimique par phéromones produits dans les glandes anales, buccales et jugales permet cette transmission d'information.

Le but du stage est de réaliser une étude préliminaire en analysant les composants des sécrétions de ces glandes et en les reliant aux caractéristiques (âge, sexe) des marmottes qui les secrètent afin de vérifier si ces sécrétions permettent effectivement de les discriminer. La poursuite de l'étude pourrait ajouter aux caractéristiques les différents allèles pour le complexe majeur d'histocompatibilité et éventuellement montrer ainsi qu'il est un critère de choix de partenaire.

Le deuxième volet concerne l'hypothèse de l'existence du « dear enemy phenomenon » chez la marmotte alpine. Ce phénomène est lié à la territorialité: la défense agressive d'un territoire peut avoir un coût en temps et en énergie important et comporte des risques (Bradbury & Vehrencamp, 1998), et la reconnaissance de voisins une fois que les frontières des territoires sont établies permet de réduire ce coût en ne les considérant plus comme des menaces imprévisibles pour le couple dominant. En revanche, un individu inconnu est potentiellement dangereux car il peut chercher à récupérer le territoire et dans ce cas une réponse agressive peut être nécessaire malgré son coût (Fisher, 1954). Cette différence entre les deux situations peut donner lieu à une différence entre les réactions, c'est le « dear ennemy phenomenon » qui a été mis en évidence chez plusieurs mammifères dont la marmotte à ventre jaune *Marmota flaviventris* (Cross & al, 2013).

Le but du stage est de tester cette hypothèse sur la marmotte alpine en exploitant les vidéos de tests de comportement réalisés en 2012 et 2013 où l'on présente différentes odeurs aux marmottes dominantes (qui doivent défendre leur territoire) et en comparant leurs réactions face aux odeurs de marmottes issues de territoires voisins ou bien totalement étrangères.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Zone d'étude et population

Tous les individus étudiés proviennent de la Réserve Naturelle de la Grande Sassièrre (Haute-Savoie). La partie étudiée de la population comprend 35 groupes familiaux d'entre 2 et 12 individus. Les données étudiées ont été récupérées entre début avril et mi-juillet en 2012 et 2013 pour les expériences comportementales, et uniquement en 2012 pour les analyses chimiques.

Prélèvement des sécrétions

Les marmottes ont été capturées en utilisant des cages à deux entrées appâtées avec du pissenlit (*Taraxacum densleonis*) et placées près des entrées des terriers principaux des différentes familles. Les marmottes sont ensuite tranquillisées avec du Zolétel 100 et les prélèvements sont réalisés à la main dans des capillaires en frottant doucement les glandes pour stimuler la sécrétion. Ils sont congelés le soir du prélèvement soit au maximum 12h après puis conservés à -20°C.

Analyse chimique des prélèvements

L'analyse des sécrétions par Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (GC/MS) permet de récupérer et séparer les éléments volatiles qui seront ceux pouvant être sentis par les autres marmottes. L'analyse par GC/MS a été réalisée en coopération avec le Centre Commun de Spectrométrie de Masse de l'Université Lyon 1 sur un Spectromètre DSQ – Thermofinnigan. L'analyse des spectres a été réalisée avec le logiciel Xcalibur (version 2.0), en utilisant une reconnaissance automatique des pics et de leur aire, ce qui permet d'avoir la quantité relative de chaque molécule dans l'échantillon.

Seules les sécrétions de glandes anales prélevées en 2012 ont été analysées ici car elles étaient d'une bien meilleure qualité en termes de contamination et de visibilité des différents composants que les sécrétions obtenues à partir des autres glandes (jugale et buccale). Les données de 2013 n'étaient pas disponibles au moment où l'étude a été réalisée.

L'analyse a porté sur 57 individus répartis en 4 classes : 28 yearlings (1 an) mâles, 14 yearlings femelles, 14 adultes (3 ans ou plus) mâles et 15 adultes femelles.

Tests de réaction aux odeurs

Le test consistait à mettre devant une entrée de terrier principal deux tubes présentant des odeurs de marmottes voisines ou étrangères aux marmottes testées et de comparer la réaction de celle-ci aux odeurs. Pour s'assurer qu'il y avait une réaction liée aux odeurs, des tubes témoins sans odeur ont aussi été utilisés. Les marmottes étaient habituées à la présence de tubes vierges au minimum 15 jours avant le début de l'expérience.

Les observations visuelles et par vidéo ont été réalisées à une distance suffisante pour ne pas déranger les marmottes. L'expérience était abandonnée si aucune marmotte ne se présentait, ou si les odeurs étaient brouillées (passage d'une marmotte non dominante, pluie).

Les odeurs ont été récupérées par frottement de tubes propres contre les glandes jugales (entre l'oeil et l'oreille) puis préservés dans du papier aluminium 3 jours au maximum. Les tubes témoins ont été également préservés à l'abri de toute contamination.

Seules les vidéos où les marmottes sentaient au moins l'un des tubes ont été gardées, puis l'analyse n'a été réalisée que sur les vidéos où les marmottes sentaient les deux tubes, pour s'assurer que la différence de réaction n'était pas liée au fait qu'elles n'avaient remarqué qu'un seul tube.

L'analyse des vidéos a mis en évidence 2 comportements principaux : « sentir » (le nez de la marmotte touche le tube) et « marquer » (la marmotte frotte sa glande jugale contre le tube) les tubes présentés. Les vidéos de la saison 2012 ont été analysées par Camille Labarrère.

Au cours des expériences, les tubes étaient placés aléatoirement de sorte à ce que les marmottes ne

s'habituent pas à une différence selon le côté.

Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec R version 2.15.1.

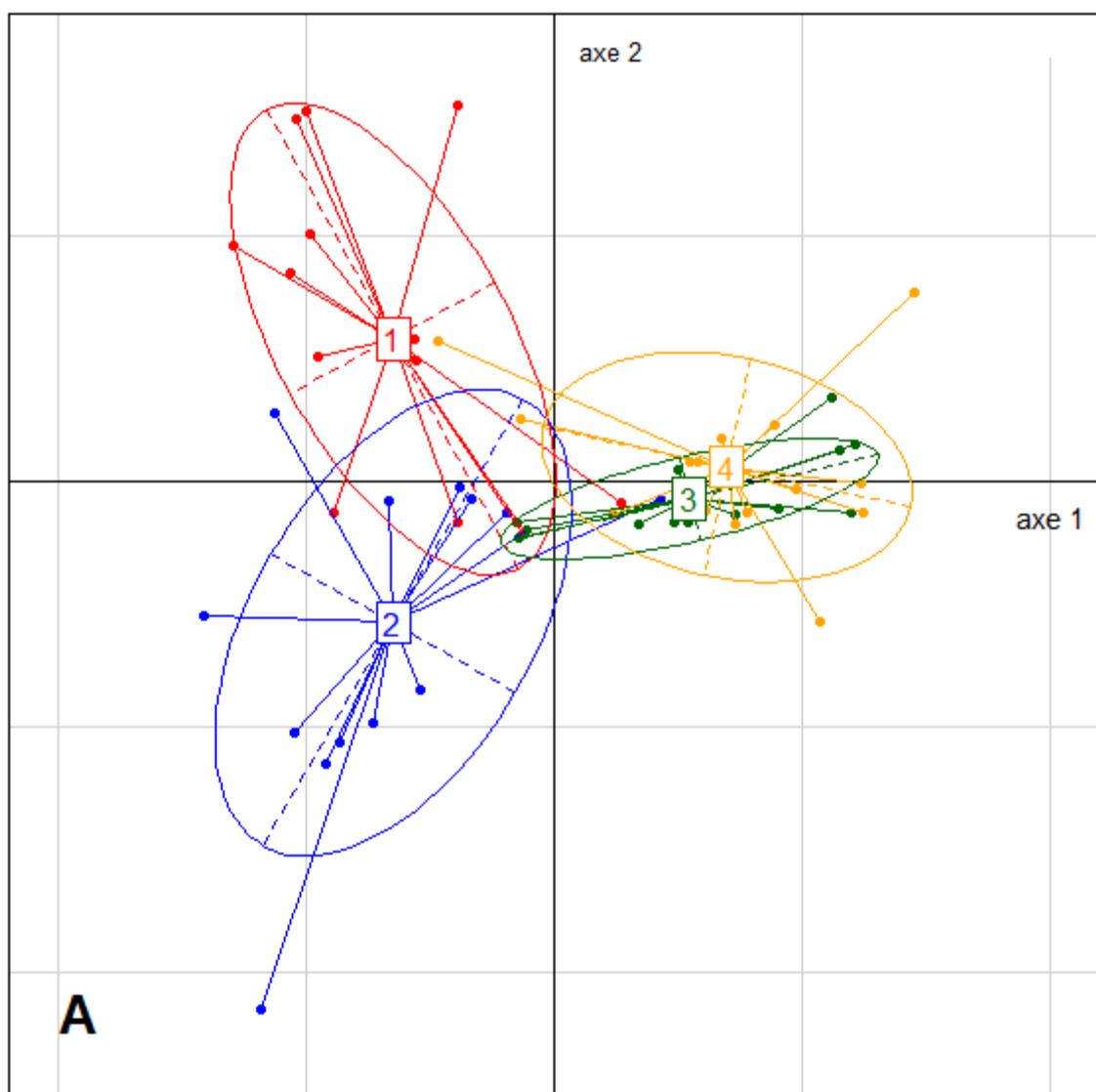
L'étude des résultats des vidéos a été faite en utilisant des tests de Wilcoxon pour des distributions non normales de données appariées, et tests de Student pour des distributions normales.

L'analyse multivariée a été utilisée pour essayer de relier l'âge et le sexe des marmottes au contenu de leurs sécrétions anales et déterminer quelles molécules étaient importantes pour cette détermination. Une analyse de variance (ANOVA) sur chaque pic permet de choisir ceux qui seront significatifs dans la discrimination, c'est sur ces pics que sera réalisée l'analyse discriminante. Celle-ci permet de dégager des axes selon lesquels les données étudiées sont le plus différenciées possibles. En observant ensuite quels sont les facteurs les plus importants dans ces axes, on peut remonter aux facteurs qui vont nous permettre de bien différencier les données, dans ce cas les molécules qui seront le plus informatives pour séparer les individus selon leur âge et sexe.

RÉSULTATS

1- Analyse chimique des sécrétions anales

L'analyse des échantillons par GC/MS a d'abord permis de différencier selon leur temps de rétention par la chromatographie en phase gazeuse 61 molécules présentes dans les sécrétions étudiées et d'en identifier une partie (Tableau 1 en annexe).



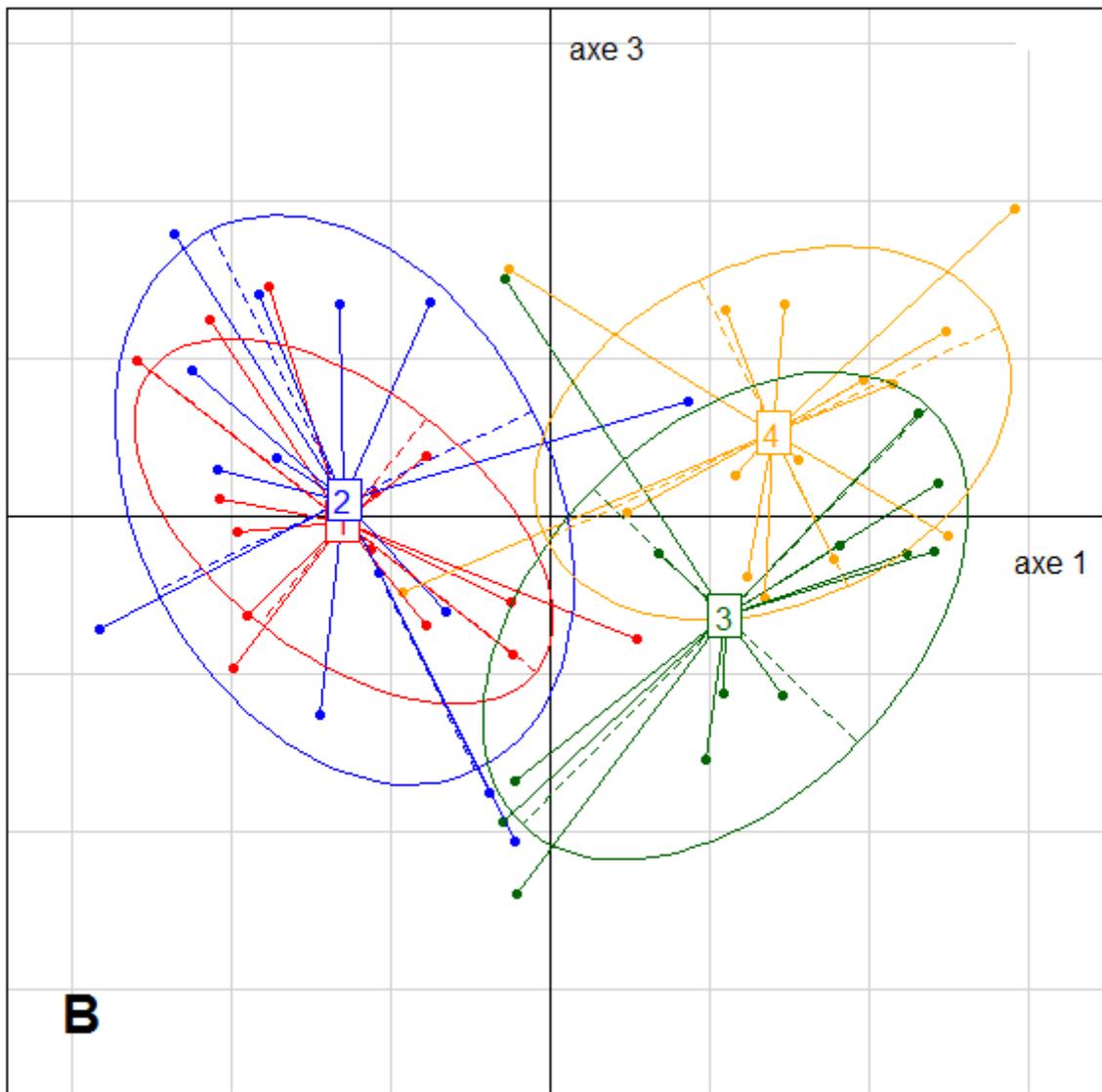


Figure 1 : Résultats de l'analyse discriminante réalisée sur 4 groupes et 13 variables (pics discriminants 5, 11, 20, 21, 26, 27, 29, 30, 32, 39, 53, 54, 59, voir Tableau 1). L'analyse permet de séparer les individus selon 3 axes discriminants : l'axe 1 sépare de façon importante les groupes 1 et 2 des groupes 3 et 4, l'axe 2 sépare les groupes 1 et 2, l'axe 3 les groupes 3 et 4. A : Selon les axes 1 et 2. B : Selon les axes 3 et 4. 1: Yearlings mâles (n=14), 2 : Yearlings femelles (n=14), 3 :Adultes mâles (n=14), 4 :Adultes femelles (n=15)

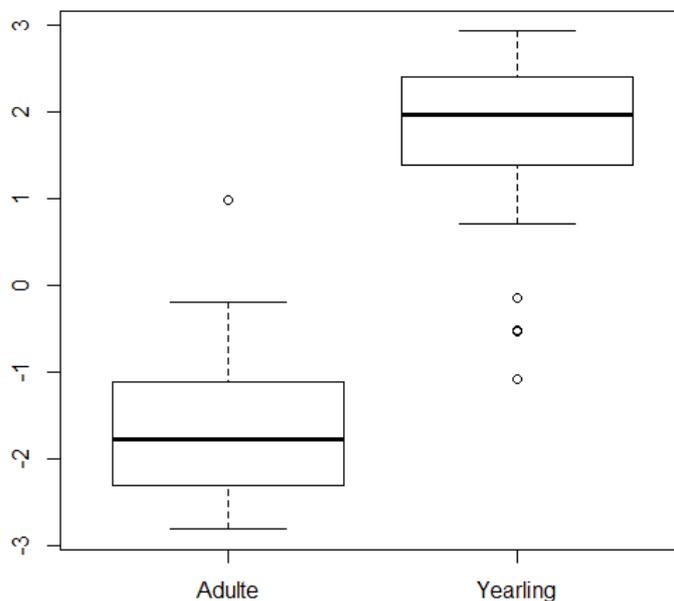
Les individus ont été classés en 4 catégories : Mâles de 1 an (1), Femelles de 1 an (2), Mâles adultes (3) et Femelles adultes (4). On dénombre 13 pics discriminants pour ces classes : 5, 11, 20, 21, 26, 27, 29, 30, 32, 39, 53, 54, 59 (Tableau 1).

L'analyse discriminante dégage 3 axes qui permettent de différencier les individus selon leur classe (Figure 1). La représentation graphique selon ces axes nous permet de voir que les yearlings (1 et 2) sont séparés des adultes (3 et 4) selon l'axe 1 (Figure 1), les yearlings mâles sont séparés de yearlings femelles selon l'axe 2 (Figure 1A) et les adultes mâles et femelles sont séparés selon l'axe 3 (Figure 1B).

Cette discrimination a pu être complétée par une analyse de la contribution des différentes molécules à la discrimination. L'analyse de la contribution des différents pics met en évidence une importance du pic 54 (donc de la molécule Cholestan-3-ol) par rapport aux autres molécules dans la discrimination selon l'axe 1. La discrimination selon l'axe 2 dépend principalement des pics 20 (n-Hexadecanoic acid), 27 (Oleic acid), 32 (molécule inconnue) et 30 ((E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester). Celle selon l'axe 3 dépend principalement du pic 53 (Cholest-5-en-3-ol (3β)).

La réalisation d'une analyse similaire en répartissant les individus en 2 classes uniquement selon leur âge donne une différenciation nette (Figure 2).

Figure 2 : Résultats d'analyse discriminante avec répartition en 2 classes uniquement selon l'âge des individus. La séparation est bien nette entre les deux groupes selon le seul axe possible. Adulte : n=29. Yearling : n=28



2- Test de l'existence du 'dear enemy phenomenon' chez la marmotte alpine

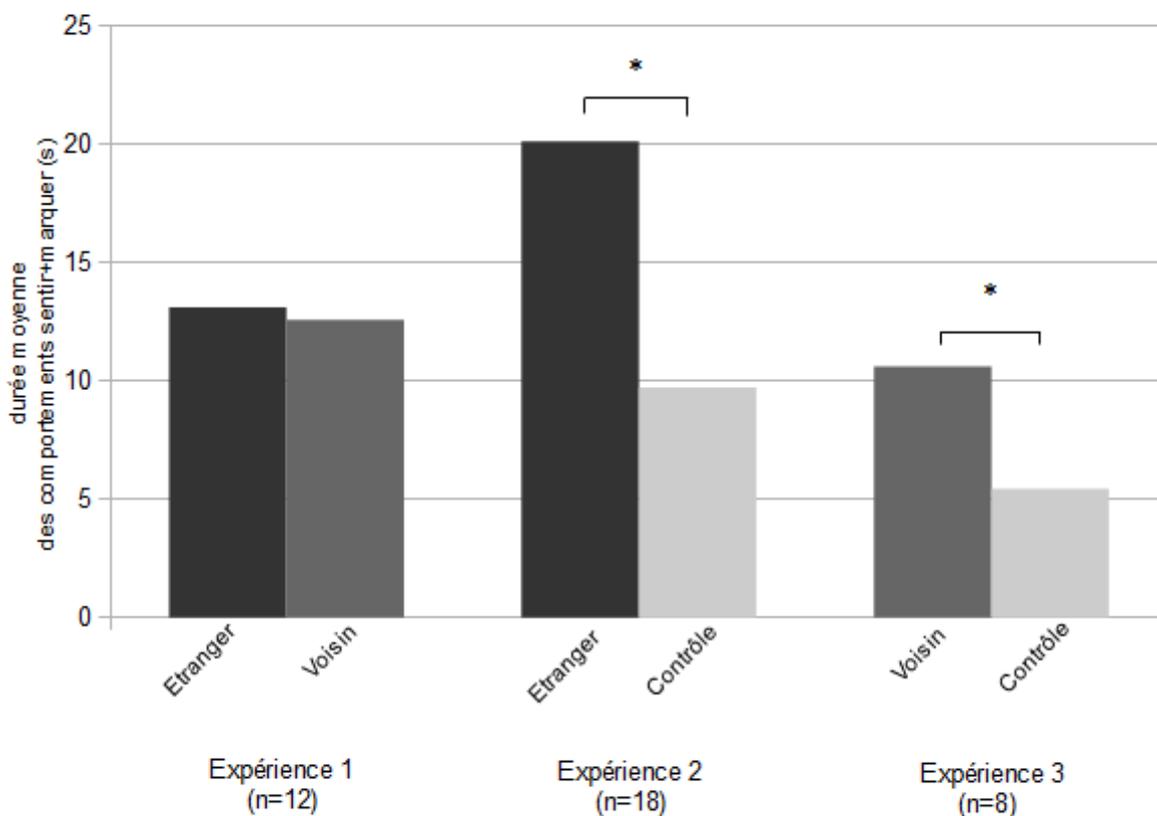


Figure 3 : Durée moyenne des comportements sentir+marquer selon les différentes expériences. La différence n'est pas significative pour l'expérience 1, en revanche les expériences contrôle 2 et 3 mettent en évidence une différence de comportement entre les tubes sans odeurs et ceux en présentant.

Expérience 1 : test t avec égalité des variances : $t = 0.1513$, $df = 22$, $p\text{-value} = 0.8811$

Expérience 2 : test de wilcoxon sur données appariées : $V = 134$, $p\text{-value} = 0.03423$

Expérience 3 : test t avec égalité des variances : $t = 2.7032$, $df = 14$, $p\text{-value} = 0.01715$

Les tests comportementaux réalisés se répartissaient en 3 expériences selon la nature des odeurs présentes sur les 2 tubes présentés à la marmotte. Les odeurs présentées étaient les suivantes :

Expérience 1 : Etranger/Voisin

Expérience 2 : Etranger/Contrôle

Expérience 3 : Voisin/Contrôle

Les données analysées ici sont celles des saisons 2012 et 2013 où les odeurs présentées sont celles de mâles dominants et les marmottes ont au moins senti les 2 tubes au cours de l'expérience.

L'étude statistique des différents résultats ne permet pas de conclure à l'existence d'un « dear enemy phenomenon » chez la marmotte alpine. En effet la durée totale des comportements « sentir » et « marquer » au cours des expériences 2 et 3 prouve que les marmottes différencient bien un tube avec odeur d'un tube sans odeur (Figure 3). En revanche, leur comportement n'est pas différent selon les tubes quand elles sont en présence d'une odeur étrangère et de celle d'un voisin (Figure 3, Expérience 1).

L'analyse séparée des durées des comportements « sentir » et « marquer » ne donne pas de différence significative pour le comportement « marquer », et des différences pour le comportement « sentir » dans les expériences 2 et 3, prouvant ainsi que c'est ce comportement qui ressort dans l'analyse globale.

L'analyse du nombre de répétitions des comportements « sentir » au lieu de leur durée ne donne pas de résultats significatifs, les marmottes réagissent donc aux odeurs en sentant plus longtemps mais pas plus de fois. Le nombre de répétition du comportement « marquer » est cependant significativement différent entre les tubes dans l'expérience 2 : les marmottes ont marqué plus de fois le tube présentant une odeur étrangère que le tube contrôle.

DISCUSSION

Les résultats obtenus par analyse des sécrétions anales permettent de différencier de façon relativement fiable les individus selon 2 caractéristiques : leur âge et leur sexe. Ceci permet de montrer que la méthode est fonctionnelle, cependant ces résultats restent préliminaires. Ils doivent être complétés par une étude plus approfondie des différentes sécrétions et de leur lien avec la communication chimique. Le but global de l'étude est de mettre si possible en évidence dans les sécrétions des différences correspondant à différents allèles des gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC). Ceci permettrait de comprendre le choix de partenaire des femelles dominantes qui peuvent choisir en fonction de l'information génétique de leurs partenaires potentiels, notamment sur les gènes du MHC.

Pour arriver à un tel résultat, il faudrait une finesse plus importante dans l'analyse des spectres, qui pourrait être atteinte par un appareil plus performant mais aussi au niveau de l'échantillonnage. En effet le travail sur les marmottes est rendu difficile par leur lieu de vie qui ne permet pas une conservation immédiate des échantillons ni un prélèvement efficace pour les glandes jugales et buccales dont les échantillons sont souvent pollués. Dans ce contexte, l'identification de molécules et la preuve qu'elles permettent de discriminer déjà des individus constitue un premier pas.

Les prélèvements ayant également été réalisés en 2013, leur analyse pourra compléter et affiner le travail entamé. Il serait possible d'ajouter à l'analyse des informations génétiques sur les individus étudiés, et ainsi de permettre la poursuite de l'étude.

L'analyse des tests comportementaux réalisés pour tester l'hypothèse de l'existence du « dear enemy phenomenon » donne des résultats qui ne permettent pas de dire que ce phénomène est présent chez la marmotte alpine. Ce phénomène ayant été mis en évidence chez d'autres marmottes (Cross & al, 2013), on peut se demander pourquoi la marmotte alpine ne le présente apparemment pas.

L'hypothèse selon laquelle le protocole ne permet pas de mettre le phénomène en évidence, soit à cause de l'analyse des vidéos qui comporte des biais (pas d'analyse des vidéos où la marmotte n'a rien senti visiblement, alors qu'elle a éventuellement senti mais pas réagi), soit à cause de biais liés à l'expérience même (odeurs mal conservées, polluées ou trop vieilles) peut a priori être rejetée grâce aux contrôles (expériences 2 et 3) qui ont montré qu'une différence de réaction peut être

visible.

L'étude est aussi rendue difficile par le faible nombre de données dû au fait que les odeurs ne peuvent être récupérées que lors des captures d'animaux dominants et n'ayant à disposition que peu d'odeurs, toutes les expériences ne peuvent être réalisées souvent. Ce problème pourrait s'atténuer si l'étude est poursuivie dans les années suivantes.

L'année 2013 a aussi vu le début de la réalisation d'expériences avec des odeurs de femelles, et ceci ouvre la voie à une étude plus approfondie sur la réaction des marmottes en fonction de leur sexe et du sexe de l'individu dont l'odeur leur est présentée. Cette aspect ne peut pas réellement être discuté pour l'instant étant donné le faible nombre d'individu qu'il y aurait dans chaque catégorie.

Ainsi dans ce cas aussi la poursuite de l'étude préliminaire sur le « dear enemy phenomenon » ne permet pas de conclure à l'existence de ce phénomène mais elle pourrait être approfondie, elle sera d'ailleurs continuée lors de la saison d'études sur le terrain en 2014.

REMERCIEMENTS

Je remercie toute l'équipe du LBBE dans laquelle j'ai pu travailler et particulièrement Dominique Allainé, mon maître de stage, et Mariona Ferrandiz-Rovira, doctorante au laboratoire, ainsi que toutes les personnes présentes sur le terrain avec qui j'ai pu apprendre beaucoup. Je remercie aussi grandement Florian Albriex et Christian Duchamp du CCSE pour m'avoir permis de travailler dans leur laboratoire et m'avoir offert leur aide précieuse.

BIBLIOGRAPHIE

BRADBURY, J.W. & VEHCAMP, S.L. (1998). Principles of animal communication. Sunderland, MA : Sinauer.

COHAS A. & AL (2006), Extra-pair paternity in alpine marmots, *Marmota marmota* : the roles of social setting and female mate choice, Behavioral Ecology and Sociobiology 55 (2006) 597-605

COHAS A. & AL (2007), Extra-pair paternity in alpine marmots, *Marmota marmota* : genetic quality and genetic diversity effects, Behavioral Ecology and Sociobiology 61:1081-1092

CROSS, H.B. & AL (2013). Do marmots display a 'dear enemy phenomenon' in response to anal gland secretions ? Journal of Zoology 289 189-195

FISHER, J. (1954). Evolution and bird sociality. In *Evolution as a proces* : 71-83. Huxley, A.C. & Ford, E.B. (Eds). London : Allen & Unwin

ANNEXE

Pic	Temps de rétention (min)	Molécule
1	4,9 - 5,05	Butanoic acid
2	5,51 - 5,65	Butanoic acid, 3-methyl-
3	5,62 - 5,74	Butanoic acid, 2-methyl-
4	6,46 - 6,52	Dimethyl sulfone?
5	6,69 - 6,87	Pentanoic acid, 4-methyl-
6	7,17 - 7,25	Phenol
7	9,42 - 9,52	2-Piperidinone
8	9,56 - 9,59	Alcane, probablement Dodecane
9	10,16	2,5-Pyrrolidinedione, 3-ethyl-3-methyl-
10	10,6 - 10,62	Indolizine ou Indole
11	10,86 - 10,9	Benzenepropanoic acid
12	11,05 - 11,06	Benzenepropanoic acid, ethyl ester
13	14,32 - 14,34	Tetradecanoic acid
14	14,52	alcool non identifié
15	14,58 - 14,59	Tetradecanoic acid, ethyl ester
16	14,76	2-Ethylhexyl salicylate
17	15,23	?
18	15,39	Homomenthylsalicylate
19	15,61 - 15,63	Hexadecenoic acid, Z-11-
20	15,73 - 15,76	n-Hexadecanoic acid
21	15,8 - 15,84	Ethyl 9-hexadecenoate

22	15,95 - 15,97	Hexadecanoic acid, ethyl ester
23	16,37	Oxybenzone
24	16,44 - 16,48	?
25	16,56 - 16,59	?
26	16,72 - 16,74	2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro-
27	16,88 - 16,94	Oleic Acid
28	16,94 - 16,97	?
29	17,02 - 17,05	Octadecanoic acid ou 9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester
30	17,06 - 17,09	(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester
31	17,1 - 17,11	?
32	17,15 - 17,17	?
33	17,2 - 17,22	Octadecanoic acid, ethyl ester
34	17,32 - 17,38	Benzoic acid, octyl ester? Ou ressemblant
35	17,49 - 17,52	?
36	17,64 - 17,66	?
37	17,81 - 17,84	?
38	17,94 - 18	Benzoic acid, undecyl ester ou ressemblant
39	18,07 - 18,13	?
40	18,19 - 18,26	9-Octadecenamide?
41	18,35 - 18,41	?
42	18,53 - 18,54	Benzoic acid, undecyl ester ou ressemblant
43	18,81	2-Propenoic acid, 2-methyl-, 1,2-ethanediylbis(oxy-2,1-ethanediyl) ester
44	18,94 - 18,95	?

45	19,09 - 19,14	?
46	19,79 - 19,8	Quinoline, 4-(2-hydroxy-2-methoxy-1-thioxyethyl)-2-phenyl-
47	19,92 - 20	?
48	20,58 - 20,6	Squalene
49	21,04 - 21,11	?
50	21,17	Cholesta-4,6-dien-3-ol, (3á)-
51	21,3	Stéroïde
52	22,65 - 22,67	Stéroïde
53	22,94 - 23,03	Cholest-5-en-3-ol (3á)-
54	23,05 - 23,13	Cholestan-3-ol
55	23,15	Stéroïde
56	23,3 - 23,33	17-(1,5-Dimethyl-hex-4-enyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol
57	23,4 - 23,5	Stéroïde
58	23,87 - 23,89	Stéroïde
59	24,15 - 24,17	Cholest-5-en-3-one
60	24,49 - 24,53	Stéroïde
61	25,22 - 25,23	Lanosterol

Tableau 1 : Liste des pics identifiés dans les sécrétions anales par GC/MS et des molécules correspondantes. Les '?' correspondent à des molécules non identifiées