

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCE ET ENVIRONNEMENTS
Ecologie évolutive, fonctionnelle et des communautés

Par Juliette POIDATZ

**De la biologie des reproducteurs au comportement
d'approvisionnement du nid, vers des pistes de biocontrôle
du frelon asiatique *Vespa velutina* en France.**

Thèse CIFRE

Sous la direction de : Denis THIERY

Soutenue le 24/11/2017

Membres du jury :

M. SANDOZ Jean-Christophe, Directeur de recherche EGCE, CNRS Gif-sur-Yvette.
M. LE-CONTE Yves, Directeur de recherche UR 406 Abeilles et Environnement, INRA Avignon.
Mme SUPPO Christelle, Directrice adjointe IRBI, CNRS Tours.
M. LHIOREAU Mathieu, Chargé de recherche UMR 5169, CNRS Toulouse.
M. THIERY Denis, Directeur de recherche UMR 1065 SAVE, INRA de Bordeaux.
Mme LABORIE Bénédicte, experte biodiversité & abeilles, Bayer SAS.

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Invité

Titre : De la biologie des reproducteurs au comportement d’approvisionnement du nid, vers des pistes de biocontrôle du frelon asiatique *Vespa velutina* en France.

Résumé : Cette thèse CIFRE porte sur la biologie, le comportement et le biocontrôle du frelon asiatique *Vespa velutina*, un prédateur invasif d’abeilles. Depuis son introduction en France, ce frelon étend maintenant son aire de répartition en Europe, impactant à la fois l’environnement et l’apiculture. L’objectif de ces travaux sera d’enrichir le savoir sur cette espèce pour perturber le développement des colonies de *V. velutina* à différents niveaux afin d’en limiter la prolifération. Le premier axe porte sur la **biologie des reproducteurs** de *V. velutina*, afin d’empêcher la fondation de colonies en amont. Ce travail précise les données concernant la maturation sexuelle des mâles de *V. velutina*, compare certains traits liés à la fertilité des fondatrices avec celles du frelon européen, et met en évidence une plus grande précocité et fertilité de *V. velutina*. Le deuxième axe porte sur la **biologie des colonies, de la collecte à la distribution des ressources dans le nid**. A l’aide de puces électroniques marquant des ouvrières (technique RFID), nous avons mesuré le rayon d’action et ses limites chez les ouvrières *V. velutina*. En marquant de la nourriture avec des métaux lourds, nous avons pu suivre l’évolution de sa distribution dans les colonies suivant leur structure. Le troisième axe porte sur le **biocontrôle de *V. velutina*** avec des champignons entomopathogènes. Nous avons évalué l’efficacité de différents isolats et de leur mode d’application contre *V. velutina*, puis décrit un champignon naturellement parasitant *V. velutina*. Ces travaux ont permis de faire avancer les connaissances sur la biologie et la physiologie des frelons, mais également de proposer des pistes de contrôle durable de l’invasion européenne de *V. velutina*.

Mots clés : insecte invasif, hyménoptère, physiologie, biologie comportementale, RFID, biocontrôle.

Title : From the reproduction biology to the foraging behaviour, towards the biological control of *Vespa velutina* in France.

Abstract : This CIFRE thesis deals with the biology, the behavior and the biological control of an invasive predator of bees, the hornet *Vespa velutina*. Since its introduction in France, this hornet is now invading most countries in occidental Europe, dealing damages both to the environment and the beekeeping activity. In order to limit its proliferation, a good strategy could consist in disrupting its colony development at different levels, explored in this work. **The first axis deals with *V. velutina* reproductive biology**, exploring the different paths to prevent colonies creation. First we described the sexual maturation of males in *V. velutina*, and second we compared different traits linked to fertility between foundresses of *V. velutina* and the European hornet, thus highlighting *V. velutina* higher precocity and fertility potential. **The second axis explored the biology of colonies**, from resource collection to resource distribution in the nest. Using RFID technic, we assessed the action range and its boundaries in *V. velutina* workers. We also labelled food and observed its distribution in *V. velutina* colonies in function of the colony size and structure. **The third axis deals with *V. velutina* biocontrol**, using entomopathogenic fungi. We evaluated the efficiency of different isolates and different application methods on *V. velutina*, and described a wild fungus found naturally parasitizing *V. velutina*. This work brought knowledge on biology behavior and physiology of this invasive hornet, and also proposed options that could be assayed for a durable control of *V. velutina*.

Keywords: Invasive insect, hymenoptera, physiology, behaviour, tracking, biocontrol, evolution.

Unité de recherche

[UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRA, Bat. D2, 71 rue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d’Ornon Cedex, France.]

Table des matières

Table des matières	4
Table des figures	8
Remerciements	11
INTRODUCTION GENERALE	15
1 <i>Vespa velutina</i> var. <i>nigrithorax</i> , un prédateur invasif d'abeilles	17
1.1 <i>Vespidae</i> et invasions	17
1.2 Introduction de <i>V. velutina</i> en Europe	19
1.3 Impact de l'invasion de <i>V. velutina</i> en Europe	22
2 Biologie de <i>Vespa velutina</i>	27
2.1 Cycle de développement	27
2.2 Généralités sur les reproducteurs chez <i>V. velutina</i>	31
2.3 Le nid de <i>V. velutina</i>	32
2.4. Organisation sociale des colonies de <i>V. velutina</i>	33
3 Etat des lieux des moyens de lutte contre <i>Vespa velutina</i>	35
3.1 Piégeages, captures de printemps	35
3.2 Protection des ruchers fin d'été-automne	37
3.3 Lutte chimique et destruction des nids	40
4 Objectifs et structure de la thèse	45
4.1 Présentation des axes de la thèse	45
4.2 Formulation des hypothèses de recherche sur lesquelles repose cette thèse	46
AXE 1 ETUDE DE LA BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ <i>VESPA VELUTINA</i>	50
A.1. Physiologie des mâles de <i>Vespa velutina</i>	51
A.1.1 Généralités sur les mâles d'hyménoptères	51
A.1.2 Organisation du tractus reproducteur mâle	52
A.1.3 Structure des testicules et spermatogenèse	53

A.1.4 Production de mâles précoces chez <i>V. velutina</i>	56
ARTICLE 1: Delayed sexual maturity of males in <i>Vespa velutina</i>	59
A.2 Physiologie des fondatrices de <i>V. velutina</i>	76
A.2.1 Organisation du tractus reproducteur femelle.....	76
A.2.1.1 Ovaires et production d’œufs.....	76
A.2.1.2 La spermathèque.....	78
Manuscrit 2: Comparison of reproductive traits of foundresses in a native and an invasive hornet in Europe	80
A.2.2 Sélection spatiale ou « Spatial sorting hypothesis ».....	96
A.2.3 Une sélection spatiale existe-t-elle chez <i>Vespa velutina</i> ?.....	97
A.3 Description du comportement de reproduction de <i>V. velutina</i>	99
A.3.1 La reproduction chez les frelons.....	99
A.3.2 Reproduction chez <i>Vespa velutina</i>	101
AXE 2 : DE LA COLLECTE A L’UTILISATION DES RESSOURCES PAR LES COLONIES DE VESPA VELUTINA	103
B.1 Nutrition de <i>Vespa velutina</i> et biologie des nids.....	104
B.1.1 Nutrition des adultes.....	104
B.1.1.1 Collecte de ressources chez les <i>Vespidae</i>	104
B.1.1.2 Polyéthisme et spécialisation.....	106
B.1.1.3 Sources de nourriture de <i>V. velutina</i>	108
B.1.1.4 Tester le degré de spécialisation des ouvrières de <i>V. velutina</i>	109
B.1.2 Nutrition de la colonie.....	111
Manuscrit 3: Studying food distribution inside <i>Vespa velutina</i> nests using heavy metal tracers	113
B.2 Rayon d’action de <i>Vespa velutina</i> autour de son nid.....	132
B.2.1 Rayon d’action et capacités de retour au nid.....	132
B.2.2 Techniques d’enregistrement et d’analyse des déplacements d’insectes.....	133
B.2.2.1 Le radar harmonique.....	133
B.2.2.2 Les caméras 3D.....	134
B.2.2.3 Emetteurs actifs.....	135

B.2.2.4 La technique du RFID (Radio-Frequency Identification).....	136
B.2.3 Application de la technique de RFID au frelon asiatique à pattes jaunes <i>V. velutina</i>	137
Manuscrit 4: Homing behaviour in an invasive honeybee predator.....	141
AXE 3 : VERS DES OPTIONS DE BIOCONTRÔLE DES COLONIES DE <i>VESPA VELUTINA</i> ?.....	163
C.1 La lutte biologique.....	164
C.1.1 La lutte microbiologique entomopathogène.....	166
C.1.2 Les mécanismes infectieux des entomopathogènes.....	167
C.2 La technique du cheval de Troie.....	169
C.3 Recherche d'agents de biocontrôle pour agir contre <i>V. velutina</i>	170
C.3.1 Présentation générale des agents de lutte étudiés.....	170
C.3.2 Méthodes d'identification de souches d'entomopathogènes.....	170
C.3.2.1 Observations morphologiques.....	170
C.3.2.2 Analyses génétiques.....	171
Manuscrit 5 (Shortnote): Description of a strain of <i>Beauveria bassiana</i> naturally parasitizing the bee predator <i>Vespa velutina</i> in France.....	173
C.4 Evaluation de l'efficacité de certains isolats d'entomopathogènes généralistes sur <i>V. velutina</i>	181
C.4.1 Biocontrôle d'adultes de <i>V. velutina</i>	181
Manuscrit 6: Indigenous strains of <i>Beauveria</i> and <i>Metharizium</i> as potential biological control agents against the invasive hornet <i>Vespa velutina</i>.....	182
C.4.2 Evaluation de l'efficacité de molécules insecticides et de champignons entomopathogènes sur les larves de <i>V. velutina</i>	198
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	199
1 Biologie des reproducteurs.....	203
1.1 Biologie des mâles de <i>V. velutina</i>	203
1.2 Biologie des femelles de <i>V. velutina</i>	204
1.3 Spatial sorting chez <i>V. velutina</i>	205
1.4 Biologie de la reproduction chez <i>V. velutina</i>	206
1.5 Hivernation.....	207
2 De la collecte des ressources à leur utilisation dans les colonies de <i>V. velutina</i>	209

2.1 Spécialisation alimentaire.....	209
2.3 Rayon d'action des ouvrières et détection des colonies.....	210
2.3 Distribution de la nourriture dans les colonies de <i>V. velutina</i>	211
3 Biocontrôle de <i>V. velutina</i>	213
3.1. Amélioration des formulations et choix des souches de champignon entomopathogènes.....	213
3.2. Evaluation de l'impact de champignons entomopathogènes sur des colonies entières...	214
Conclusion générale.....	216
 ANNEXES	 219
ANNEXE 1.1: Sélection spatiale chez <i>Vespa velutina</i> : Compromis entre traits dispersifs et reproductifs chez les fondatrices de <i>V. velutina</i> entre la Bretagne, l'Italie et le Bordelais.....	221
ANNEXE 1.2: Sélection spatiale chez <i>V. velutina</i> : Projet EUROFRELON : Evaluation d'une potentielle sélection spatiale chez <i>Vespa velutina</i> en Europe.....	231
ANNEXE 1.3. Describing the mating behavior of <i>Vespa Velutina</i> , in laboratory conditions.....	234
ANNEXE 2.1 : Evaluation de la spécialisation pour la collecte d'un type de nourriture chez les ouvrières de <i>Vespa velutina</i>	247
ANNEXE 3.1 : Evaluation de l'efficacité de molécules insecticides et de champignons entomopathogènes sur les larves de <i>Vespa velutina</i>	255
ANNEXE 4 : Congrès et formations.....	260
 REFERENCES.....	 263

Table des figures

--- Introduction générale ---

Figure 1	20
Figure 2	21
Figure 3	23
Figure 4	28
Figure 5	31
Figure 6	33
Figure 7	36
Figure 8	37
Figure 9	42

--- Axe 1 ---

Figure 10	52
Figure 11	53
Figure 12	54
Figure 13	55
Figure 14	56
Figure 15	75
Figure 16	75
Figure 17	77
Figure 18	98

--- Axe 2 ---

Figure 19	109
Figure 20	134
Figure 21	135
Figure 22	136
Figure 23	138

Figure 24	139
-----------------	-----

--- Axe 3 ---

Figure 25	166
Figure 26	168
Figure 27	171

--- Discussion générale ---

Figure 28	210
Figure 29	211
Figure 30	215

--- Annexes Axe 1---

Figure 31	224
Figure 32	225
Figure 33	228
Figure 34	232
Figure 35	233
Figure 36	236
Figure 37	237
Figure 38	240
Figure 39	242
Figure 40	243
Figure 41	244

--- Annexes Axe 2 ---

Figure 42	249
Figure 43	251

--- Annexes Axe 3 ---

Figure 44	256
Figure 45	257
Figure 46	257
Figure 47	258

Remerciements

Cela fait maintenant 5 ans que j'évolue dans l'UMR Save, et je tiens donc tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Dr. *Denis Thiéry*, pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer cette thèse avec une grande autonomie. Merci de penser qu'une thèse est un des moments clés dans la vie d'un scientifique, et se doit d'être une expérience épanouissante. Merci de m'avoir encouragé à créer des collaborations en France et à l'étranger, *via* de nombreux séjours, accueils et congrès scientifiques. Bref, merci pour cette liberté et cette confiance que tu m'as accordé tout au long de mon séjour ici.

Je souhaite également remercier Dr. *Jean-Christophe Sandoz* et Dr. *Yves Le Conte* d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, ainsi que Dr. *Christelle Suppo* et Dr. *Mathieu Lihoreau* pour leur participation en tant que membres du jury. Merci également à *Bénédicte Laborie* de Bayer pour m'avoir soutenue et beaucoup appris en gestion de projet et d'équipe.

Mon aventure avec le frelon a démarré avant cette thèse, et je tiens à remercier la « Dream team frelon » pour m'avoir permis de m'y embarquer. Tout d'abord *Olivier*: nos imitations de Golum et Gandalf, les aventures lors de récupération de nids, le ventre de tu sais-qui, les cafés-apiculteurs, tous resteront dans ma mémoire. *Karine*, avec qui j'ai eu la chance de pouvoir continuer de travailler durant ma thèse, pour m'avoir tant appris grâce à ses connaissances très étendues et son humour. Un grand merci également à *Christophe*, qui a su faire germer et cultiver en moi cet aspect « recherche » à partir de ma passion pour l'entomologie, et avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler durant cette thèse. Merci également à *Antoine*, dont le passage dans notre labo pendant sa thèse a contribué à mon envie de me lancer dans la mienne, et merci à « ma » super M2 *Salomé*, future reporter scientifique.

Merci à mes co-thésardes et amies *Lucile* et *Aurélia* pour leur soutien dans la joie et dans les coups durs lors de cette thèse. Entre la boîte magique et la chanson du vendredi soir, l'ambiance était parfaite! Merci également aux Post-docs qui ont partagé cette aventure, *Fanny* (et Tilt!), *Ramsès*, *David* et *Yann*. Merci à *Jojo* pour ses délires et sa musique, merci à la chorale *Arthur* et *Delphine* (ma super bad partner) ainsi qu'à *Benjamin* pour leur humour et l'ambiance qu'ils ont su créer au fil du

Remerciements

temps en labo entomo. Merci à ma mauvaise herbe argentine *Rodrigo* pour sa passion et ses connaissances partagées sans mesures. Merci à mon compagnon, *Samuel*, de m'avoir épaulée et soutenue au jour le jour, et supportée malgré le stress ressenti. Merci d'avoir toujours accepté avec compréhension mes horaires et mes soirées chargées. Merci à ma famille d'avoir soutenu une thésarde de plus, avec ces hauts et ces bas, et ce rythme de vie si particulier. Merci à ma grande sœur *Dorothée* et ses précieux conseils pour la rédaction de la thèse. Merci à *Avril* pour avoir relu et corrigé l'anglais de plusieurs manuscrits avec rigueur et grande efficacité !

Merci à l'ensemble des membres temporaires ou permanents de l'UMR SAVE avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler ou simplement d'échanger à travers mes missions (CDD's) et ma thèse: *Gilou* et *Isa* (entre belotte et pathologie végétale), *Pascale* (merci pour ton enthousiasme communicatif), *Jérôme*, *Domi* (merci pour ta pédagogie et ton énergie), *Jean* (Merci d'être venu m'apporter du matériel sur le terrain pour une manip à 19h30), *Jess*, *Carlos* (mon padawan de bad), *Awatef*, *Amira*, *Rana* (merci les filles pour votre bonne humeur et les pâtisseries tunisiennes régulièrement partagées en salle café !), *Chloé* et *Anthony* (toujours avec le sourire), *Jonathan*, *Fred* et *Adrien* (Merci pour votre humour et votre accessibilité), *Sonia* et *Marie-Christine* (merci de vous être rendues disponibles même dans des moments compliqués), *Sly*, *Marie-Momo* (te souviens-tu de la chasse aux frelons dans les bananiers de ton jardin ?), *Lionel Dr.* , *Lionel De.* (bon courage pour ta thèse), *Pierre*, *Laurent*, *Jean-Marc* (merci particulier pour un sac égaré tu sais où). Merci à *Christian* notre menuisier aux mains d'or de m'avoir permis de réaliser certains systèmes expérimentaux avec gentillesse et grand professionnalisme. Et enfin un merci particulier à celle sans qui je n'aurais probablement jamais mis les pieds à l'UMR SAVE à l'origine, *Daciana*, ma tutrice lors de mes études à BSA. Merci également à la « Team bad » (*Angé*, la coupe bad INRA 2017 restera dans les annales !) et au club dessin (*Suzann* et *Esmé*) où j'ai eu la chance de passer du temps.

I also want to thank the whole « Firenze team » that I met in Italia, *Ale*, *Rita* and *Fede*, but also the beekeepers I worked with during the field work for queens collection, especially *Anna*, *Fabrizio* and *Nuccio*.

Remerciements

Merci à mes amis de l'agro d'avoir agrémente cette étape de ma vie de leurs passages et de moments forts ensemble, et merci à *René* pour ton soutien sans faille et tes conseils.

INTRODUCTION GENERALE



INTRODUCTION GENERALE

L'objectif de ces travaux de recherche est **d'approfondir notre compréhension des colonies de *Vespa velutina*, allant de leur initiation (Axe 1) jusqu'à leur fonctionnement global (Axe 2), avec comme but final le développement de stratégies de lutte axées sur la perturbation de la colonie adaptées et durables (Axe 3)**. La biologie et l'écologie de *V. velutina* ont été synthétisées dans les travaux de [Monceau et al. 2014a](#), et nous allons dans cette introduction mettre l'accent sur certains aspects d'intérêts pour la compréhension des différents axes traités dans cette thèse. Cette introduction traitera tout d'abord de l'invasion de *V. velutina* en Europe, puis de sa biologie, des moyens de lutttes actuels, pour finir sur les hypothèses de recherches et objectifs de cette thèse. Cette thèse sur articles est divisée en trois axes articulés autour du contexte bibliographique et des résultats associés aux articles scientifiques qui les illustrent. Chaque axe contiendra des annexes regroupant les expériences préliminaires et complémentaires non publiées dans les articles.

Introduction générale

- *Vespa velutina*, un prédateur invasif d'abeilles
 - Biologie de *V. velutina*
- Etat des lieux des moyens de lutte contre *V. velutina*
 - Objectifs et structure de la thèse

AXE 1 : Biologie de la reproduction chez *V. velutina*

Physiologie des mâles

- Généralités sur les mâles
- Organisation du tractus reproducteur
- Structure des testicules et spermatogenèse
- Production de mâles précoces

Article 1 : Delayed sexual maturity in males of *Vespa velutina*. Publié dans *Insect Science*

Physiologie des fondatrices

- Généralités sur les fondatrices
- Organisation du tractus reproducteur
- Comparaisons interspécifiques

Article 2 : Compared reproductive traits of foundresses in a native and an invasive hornet in Europe. Soumis à *Journal of Insect Physiology*

- Spatial sorting chez *V. velutina* ?

Annexe 1.1 compromis entre traits dispersifs et reproductifs chez les fondatrices de *V. velutina* entre la Bretagne, l'Italie et le Bordelais

Annexe 1.2 Projet EUROWELON : évaluation d'une potentielle sélection spatiale chez *V. velutina* en Europe

La reproduction chez *V. velutina*

- La reproduction chez les hyménoptères
- Etude de la reproduction chez *V. velutina*

Annexe 1.3 La reproduction chez *V. velutina*

AXE 2 : De la collecte à l'utilisation des ressources par les colonies de *Vespa velutina*

Nutrition de *V. velutina* et biologie des nids

- Nutrition des imagos
- Tester le degré de spécialisation des ouvrières de *V.*

Annexe 2.1 Evaluation de la spécialisation pour la collecte d'un type de nourriture chez les ouvrières de *Vespa velutina*.

- Nutrition de la colonie

Article 3 : Studying the food distribution in *Vespa velutina* nests using heavy metals. In prep.

Rayon d'action de *Vespa velutina* autour de son nid

- Rayon d'action et capacité de retour au nid
- Techniques d'enregistrement et d'analyse des déplacements d'insectes
- Application de la technique du RFID à *V. velutina*

Article 4 : Homing behaviour in an invasive honeybee predator. Soumis à *Journal of Pest Science*

AXE 3 : Vers un biocontrôle des colonies de *Vespa velutina* ?

Lutte biologique

La technique du Cheval de Troie

Biocontrôle d'adultes de *V. velutina* par des entomopathogènes

Article 5 : *Beauveria* and *Metarhizium* isolates as potential biological control agents against the invasive hornet *Vespa velutina*. Soumis à *Journal of Invertebrate Pathology*.

Description d'une souche de *B. bassiana* naturellement parasite de *V. velutina* en France.

Shortnote: Description of a strain of *Beauveria b.* naturally parasitizing the bee predator *Vespa velutina* in France. In prep

Annexe 3.1 Evaluation de l'efficacité de molécules insecticides et de champignons entomopathogènes sur les larves de *V. velutina*

1 *Vespa velutina* var. *nigrithorax*, un prédateur invasif d'abeilles

1.1 *Vespidae* et invasions

Le monde observe, depuis un siècle, une augmentation très importante de la fréquence des invasions biologiques, entraînant un nombre croissant de déséquilibres écologiques, sanitaires, et par conséquent agronomiques (Vitousek *et al.* 1997, Mooney & Cleland 2001, Van der Velde *et al.* 2006). Une espèce est considérée comme invasive lorsque, une fois introduite dans son nouvel écosystème, elle est sujette à une explosion démographique et une forte dispersion (Williamson 1996, Mack *et al.* 2000, Allendorf & Lundquist 2003). Mais pour d'autres spécialistes, une espèce ne rentre dans cette catégorie que si elle inflige des dégâts au sein des écosystèmes, impactant l'économie ou la santé humaine (UICN, 2009). Une invasion biologique est caractérisée par plusieurs étapes : premièrement, **l'introduction**, lorsqu'un ou plusieurs individus d'une espèce sont transportés hors de leur aire d'origine, le plus souvent par l'Homme (volontairement ou involontairement). Deuxièmement, **l'établissement** : l'espèce va alors devoir être capable de s'établir, *i.e.* de se développer de manière à créer une population viable sur le long terme. Une fois l'espèce établie, elle rentrera dans la dernière phase, après un temps de **latence** plus ou moins long suivant les espèces et les environnements, **la propagation**. Les populations pullulent alors, se dispersent et colonisent de nouveaux territoires. Le coût des invasions biologiques est loin d'être négligeable, que cela soit d'un point de vue environnemental mais également financier (Vitousek *et al.* 1997, Chapin *et al.* 2000, Simberloff *et al.* 2013). Par exemple, une étude de Bradshaw *et al.* (2016) estime un cout total de 70.0 milliards de dollars par an pour les seuls insectes invasifs dans le monde. Ce phénomène serait favorisé par de nombreux facteurs environnementaux, comme entre autres le réchauffement climatique, l'augmentation de la densité de population humaine et l'intensification des échanges commerciaux et touristiques internationaux avec la mondialisation (Garnas *et al.* 2016, Courchamp *et al.* 2017). L'étude des organismes invasifs est donc un challenge scientifique de premier ordre (Simberloff *et al.* 2013).

Les hyménoptères sociaux font partie des envahisseurs biologiques les plus fréquents. Leur sociabilité leur procure en effet de nombreux atouts pour potentiellement réussir à envahir de nouveaux territoires (Moller 1996, Holway *et al.* 1998, 1999): une forte adaptabilité, une grande force d'exploration, une mutualisation des ressources efficace, une répartition des tâches parfois poussée à l'extrême avec des cas de polymorphismes suivant les rôles (par exemple chez certaines fourmis), une hygiène et des stratégies de désinfection de la colonie optimisées (immunité sociale) (Cremer *et al.* 2007), une fertilité très élevée et enfin une production de très nombreux reproducteurs souvent capables de dispersion (Pamilo 1991, Chapman & Bourke 2001). Le succès de l'établissement de tels insectes dans de nouveaux environnements dépend donc essentiellement de la capacité d'une fondatrice à survivre lors de son transport dans une nouvelle région, à s'acclimater afin de réussir à trouver les éléments nécessaires à l'initiation de sa colonie (matériaux de construction, nourriture, eau), et de finir son cycle biologique, *i.e.* produire de nouveaux reproducteurs fertiles (Moller 1996).

Les *Vespidae* sont la plupart du temps des prédateurs généralistes, capables de faire varier leur bol alimentaire suivant l'abondance de certaines espèces de proies, le cycle des saisons et d'une année sur l'autre (Spradbery 1973, Harris 1991). De ce fait, ils possèdent une plasticité élevée leur permettant une adaptation facile à un nouvel environnement (Richter 2000) (pour plus de détails sur l'alimentation de *V. velutina*, voir l'axe 2). Les *Vespidae* collectent à la fois des ressources carbonées (nectar, miellat) et protéiques (insectes, cadavres) (Spradbery 1973, Richter 2000) ; ils entrent donc en compétition directe et indirecte avec de nombreuses espèces de vertébrés (oiseaux en particulier) et d'arthropodes (Beggs & Wilson 1991, Moller *et al.* 1990, Toft & Rees 1998, Beggs & Rees 1999, Beggs 2001). Les insectes sociaux invasifs peuvent ainsi être une menace pour leur environnement d'accueil, en causant des changements dans sa composition (Howarth 1985, Wojcik 1994, Moller 1996, Beggs 2001), mais également en créant des effets 'boules de neige', *i.e.* des cascades d'impacts, sur de nombreux processus écologiques (Beggs 2001). Par exemple en Nouvelle Zélande, les invasions des forêts par *Vespula germanica* et *V. vulgaris* ont entraîné des effets néfastes sur la biodiversité directement (prédation de nombreux arthropodes), mais surtout indirectement : leur consommation de miellat dans des quantités très importantes (Moller & Tilley 1989) a évincé de ces

milieux les consommateurs natifs de miellat (oiseaux, insectes) qui se sont alors trouvés en compétition pour cette ressource. Des conséquences indirectes insoupçonnées en ont découlé : la modification de la répartition des ressources nutritives a induit une perturbation du cycle de l'Azote, provoquant une modification de la composition du sol, des communautés microbiennes et par la suite de la végétation native elle-même (Beggs 2001).

La famille des *Vespidae* regroupe de nombreux cas d'invasions biologiques (Cervo *et al.* 2000, Beggs *et al.* 2011): *Vespa orientalis* (Linnaeus 1771) en Amérique du sud (Dvorak 2006), les guêpes *Vespula* (yellowjacket wasps) en Amérique du nord (Jacobson *et al.* 1978), au Mexique (Eck 1993), et au Honduras (Hunt *et al.* 2001). La Nouvelle Zélande a été envahie à la fois par *V. germanica*, *V. vulgaris* et *Polistes chinensis antennalis* (Harris 1979, Harris 1991, Clapperton *et al.* 1996, Beggs 2001). Le frelon européen *V. crabro* est également un bon exemple de *Vespidae* invasif: il présente une aire de répartition naturelle très étendue, allant de l'ouest de l'Europe tempérée jusqu'à l'Est de l'Asie (Carpenter & Kojima 1997), et a été introduit volontairement à l'Est de l'Amérique du nord au milieu du 19^{ème} siècle, et s'y est maintenant bien établi (Shaw & Weidhaus 1956). *V. crabro* aurait également été introduit aux alentours de 2005 au Guatemala, mais il ne semblerait pas s'y être établi (Landolt *et al.* 2010).

1.2 Introduction de *V. velutina* en Europe

Vespa velutina (Lepelletier 1836) (Figure 1) est un insecte de l'ordre des Hyménoptères et de la famille de *Vespidae*, qui comprend au moins 12 sous-espèces en Asie (Villemant *et al.* 2011). La sous-espèce *V. velutina* var. *nigrithorax* (Du Buisson 1905) est considérée originaire de régions tempérées d'Asie du Sud-Est, entre le Cachemire, le Bhoutan et la Chine. Mesurant 17 à 32mm de long, le corps de cet insecte est brun-noir, avec des fins liserés jaunes sur les segments abdominaux, et le 4^{ème} segment entièrement jaune-orangé. Ses pattes ont les extrémités jaunes, d'où son nom commun de « frelon asiatique à pattes jaunes ». La tête et les antennes sont noires, et sa face est orangée (Figure 1).

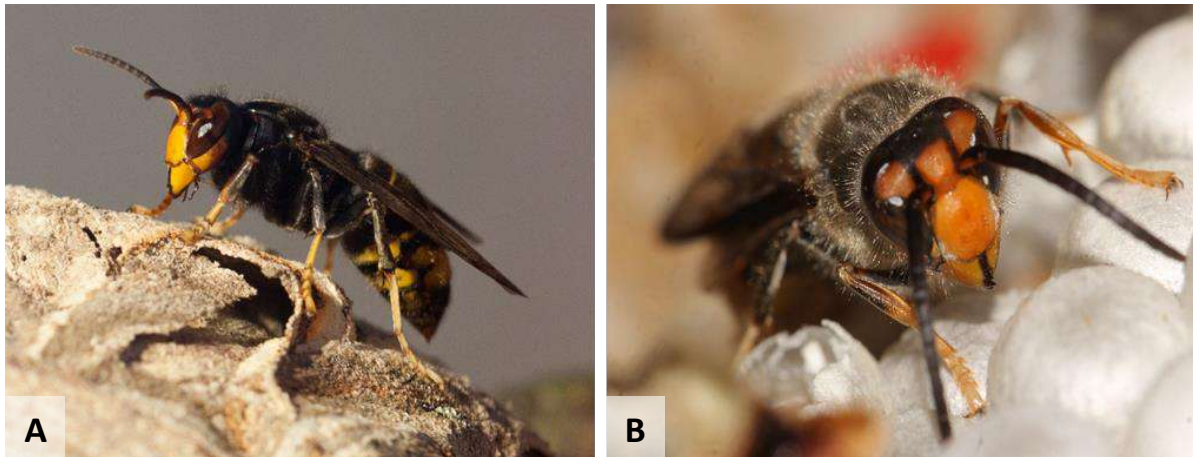


Figure 1 : Ouvrière (A, photo K. Monceau) et mâle (B, photo N. Hénon) de *Vespa velutina* var. *nigrithorax*. Le mâle venant d'émerger, ses soies sont encore argentées : elles noirciront en 48h.

Le premier nid de *V. velutina* var. *nigrithorax* en Europe a été découvert en 2004, dans le Lot et Garonne près de Villeneuve lès Agen (France) (Rortais *et al.* 2010). Des études génétiques grâce à des marqueurs moléculaires microsatellites ont permis de mettre en évidence qu'un seul événement d'introduction était le plus probable, celui d'une reine fécondée par 5 mâles (Arca *et al.* 2015). Cette reine présentait un fort taux d'analogies génétiques avec des individus de l'Est de la Chine (Arca 2012a,b, Arca *et al.* 2015). De nombreux leviers de connaissance autour de la biologie des reproducteurs seront étudiés dans l'Axe 1 de ces travaux.

Depuis son introduction, *Vespa velutina* est invasif dans plusieurs pays d'Europe (Figure 2) : en France (Rortais *et al.* 2010, Monceau *et al.* 2014a), en Belgique (Rome *et al.* 2013), en Italie (Demichelis *et al.* 2013, Porporato *et al.* 2014), en Espagne (López *et al.* 2011), au Portugal (Grosso-Silva & Maia 2012), et en Allemagne (Witt 2015). A l'Automne 2016 il a été observé en Angleterre (Keeling *et al.* 2017) et en Ecosse au printemps 2017 (P. Kennedy, pers. Com). Son aire de répartition évolue également en Asie puisqu'il est maintenant invasif en Corée (Choi *et al.* 2012), ainsi qu'au Japon (Ueno 2015).

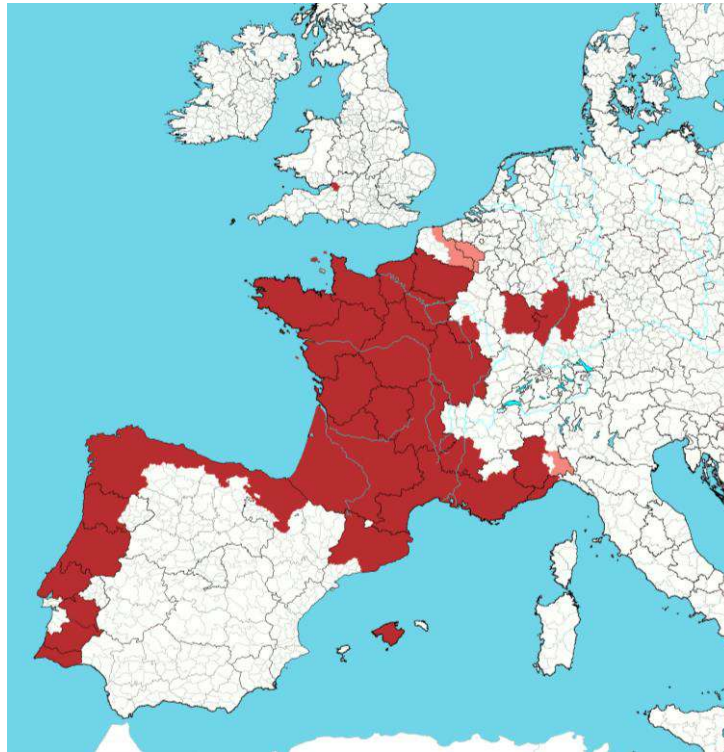


Figure 2 : Aire de répartition de *V. velutina* en Europe (Source Kick Off European meeting *Vespa velutina* Coloss 2016, LIFE VESPA)

Les nids de *V. velutina* sont fixes, et la dispersion de cette espèce repose donc sur les capacités de dispersion des fondatrices : elles peuvent se déplacer soit à l'Automne lorsque qu'elles quittent leur nid pour trouver un site d'hivernation, soit au printemps pour trouver un site de nidification propice au développement de leur colonie ([plus de détails sur la biologie des colonies en 2 et Axe 2](#)). Des modélisations spatiales ont été effectuées quant à la dispersion de *V. velutina* en Europe, et il semblerait que (1) *V. velutina* envahisse des zones climatiquement proches de celles de son aire de répartition initiale ([Villemant et al. 2011](#), [Barbet-Massin et al. 2013](#)) ; (2) sa distribution dépende en grande partie de la présence d'axes routiers ([Goldarazena et al. 2015](#)), ce qui impliquerait des possibilités de transport passif par des véhicules, ou la facilitation de migration des fondatrices le long de ces « landmarks » directionnels (hypothèse également formulée dans [Monceau et al. 2014a](#)). Une part mineure de dispersion serait également liée à la présence du réseau d'eau douce ([Bessa et al. 2016](#)); (3) A une échelle plus locale, des études récentes de [Monceau & Thiéry 2017](#) ont montré une agrégation des colonies près de sites riches en sources de nourriture et d'eau continue dans le temps (villes, déchetteries, campings, étals de marchés, etc), ressources qui sont, outre les fibres végétales

utilisées pour la construction du nid, les seuls besoins d'une fondatrice au printemps.¹ Dans l'Axe 1, nous discuterons de capacités de dispersion des fondatrices en Europe, en explorant la possibilité d'une évolution morphologique de ces dernières, suivant l'hypothèse évolutive du **Spatial sorting**².

1.3 Impact de l'invasion de *V. velutina* en Europe

Les frelons sont des prédateurs généralistes d'arthropodes, connus pour être parfois des prédateurs d'autres espèces d'insectes sociaux, plusieurs espèces s'attaquant à des guêpes et des abeilles, prélevant adultes, larves, pupes et réserves glucidiques (miel) de leur nids (Matsuura & Yamane 1990).

1.3.1 Impact de *V. velutina* sur les abeilles domestiques

Vespa velutina favorise la chasse de l'abeille domestique européenne *Apis mellifera* si cette dernière est présente dans son environnement (Tan *et al.* 2007, 2010). Agiles, les ouvrières de *V. velutina* prélèvent des abeilles butineuses devant les ruches (Figure 3.A), souvent à plusieurs (Abrol 1994, Monceau *et al.* 2013b, c). La pression exercée par les ouvrières de *V. velutina* sur les ruchers augmentera de plus en plus tout au long de l'été, pour en automne atteindre un pic de prédation (en général de fin juillet à fin septembre) (Monceau *et al.* 2013b). Les frelons vont ensuite tenter de rentrer dans les ruches, alors affaiblies, pour piller les stocks de miel (Figure 3.B). Les ruches vigoureuses avec de fortes populations d'abeilles sont toutefois des ressources dangereuses à exploiter pour les frelons, du fait qu'elles se défendent. Leur prédation n'aura alors lieu que lorsque les populations de

¹ Les fondatrices n'ont jusque maintenant jamais été observées attaquant les abeilles devant les ruches, (chasse trop risquée) les ruches n'ont donc aucune raison de structurer spatialement la distribution des nids.

² Spatial sorting : hypothèse évolutive qui postule qu'une population d'organisme en extension accumule certains traits associés à la dispersion et à l'exploration sur les marges de son aire de répartition.

frelons sont suffisamment résilientes pour compenser les pertes collatérales, en fin d'été (Monceau *et al.* 2013b).

Vespa velutina ne pose que rarement problème dans son aire d'origine, i.e. l'Est de la Chine, car premièrement elle y cohabite avec 22 autres espèces de frelons, dont une espèce entre autres prédatrice de frelons, *Vespa mandarinia*, et deuxièmement car *Apis cerana*, l'abeille asiatique, a développé des comportements de défense efficaces contre *V. velutina* (Tan *et al.* 2012). Cependant, l'abeille européenne *Apis mellifera*, introduite volontairement en Asie au siècle dernier pour ses meilleurs rendements et son meilleur caractère, est très touchée par ce prédateur (Matsuura 1988). Que cela soit en Europe ou en Asie, *A. mellifera* n'arrive pas à développer de comportement de défense efficace face à ce prédateur (Matsuura 1988, Arca *et al.* 2014). Il est vrai que nos abeilles domestiques ont été sélectionnées depuis des centaines d'années pour leur douceur et leur productivité, mais peu sur leur résistance (Oldroyd 2007).



Figure 3 : A. Ouvrière de *V. velutina* en vol stationnaire devant une ruche en début de saison, les abeilles européennes stressées forment un tapis sur la planche d'envol de celle-ci (Photo, K. Monceau). B. Ouvrières de *V. velutina* en chasse devant une ruche et agrégées en grand nombre sur la planche d'envol de celle-ci, presque vide en fin de saison (Photo, F. Meignaud).

Le prélèvement intensif d'abeilles par les chasseuses de *V. velutina* est un stress important pour les colonies d'abeilles (Tan *et al.* 2007, Monceau *et al.* 2013b), qui limitent alors le butinage pour tenter de protéger leurs ruches (comportement de tapis, Figure 3.A). Ce stress dans la période critique de préparation de l'hibernation implique une baisse des réserves de la colonie d'abeilles. Cette situation peut provoquer la mort de la colonie affaiblie pendant l'hiver, son attaque par des parasites secondaires (par exemple par la fausse teigne *Galleria mellonella*) ou son essaimage tardif (Matsuura

1988, Monceau *et al.* 2014a). Si l'attaque de *V. velutina* atteint un stade de pillage, *i.e.* quand les frelons réussissent à percer les défenses de la ruche et pénétrer dans son enceinte, la colonie d'abeille est alors condamnée (Figure 3.B). Lors de l'ouverture de la ruche, on remarquera alors la cire « mâchée » par les frelons pour y collecter du miel. Les abeilles sont soumises actuellement à de nombreuses pressions, que cela soit par la baisse de qualité et de quantité des ressources alimentaires, la destruction des habitats, la pollution, les résidus de produits phytopharmaceutiques, les maladies émergentes (virus, noséma) transmis par des parasites (ex : *Varroa destructor*), des pratiques apicoles parfois trop intensives (déplacement, récolte) (Brown & Paxton 2009, Cameron *et al.* 2011, Bommarco *et al.* 2012, Goulson *et al.* 2015) ; la menace que représente la présence de *V. velutina* dans ce contexte est donc loin d'être négligeable, et devient critique lorsqu'elle se rajoute à ces nombreux facteurs de dépérissement des colonies .

Le réel impact de *V. velutina* sur les ruchers n'est toutefois pas encore clairement mesuré. Il est en effet compliqué d'évaluer l'impact individuel de chaque facteur impliqué dans la survie des colonies d'abeille (Goulson *et al.* 2015). De plus, les ruchers les plus impactés ne sont pas les ruchers professionnels, souvent nomades ou faciles à déplacer suivant les variations environnementales, mais bien les petits ruchers sédentaires des apiculteurs amateurs, moins facilement contrôlables. Les travaux de thèse d'A. Fournier (*in prep.*) portant sur l'évaluation de l'impact de cette invasion sur les ruchers par le biais de modèles sociaux économiques, devraient apporter des éléments de réponses sur ce sujet. De plus, l'application smartphone ANIMALIA, projet de science participative lancé en 2015 en partenariat avec l'Université de Florence, aura pour objectif de chiffrer et de mesurer la prédation des frelons asiatiques par un maximum d'apiculteurs, professionnels et amateurs ([plus d'informations sur ce sujet en discussion](#)).

1.3.2 Impact de *V. velutina* sur l'environnement

Premièrement, les **prédateurs** sont des espèces dites « clé de voute » en écologie³ (Mills *et al.* 1993), ce qui implique que leur ajout ou leur suppression d'un écosystème entraîne de nombreux déséquilibres sur les communautés liées à cette prédation, directement ou indirectement (Paine 1966). *Vespa velutina* est un prédateur généraliste : il s'attaque à différentes espèces d'abeilles sauvages ainsi que des bourdons (Monceau & Thiéry, *per. Obs.*), mais également à de nombreux autres arthropodes (diptères, lépidoptères en majorité, et autres hyménoptères, Beggs *et al.* 2011). L'impact de *V. velutina* sur l'entomo-biodiversité est donc évident (Snyder and Evans, 2006), même si très peu mesuré, et il a été jusque-là sous-estimé. Certains cas de prédation sur des oisillons au printemps ont également été recensés (Ligue pour la Protection des Oiseaux, *pers. Com.*), un comportement similaire a été observé en Nouvelle Zélande par les espèces de guêpes invasives *Vespula germanica* & *V. vulgaris* (Moller 1990). La pullulation de *V. velutina* en Europe est une menace de grande importance pour les pollinisateurs, et donc pour la biodiversité européenne en général.

Deuxièmement, l'introduction de *V. velutina* pourrait avoir un effet de **compétition** avec d'autres espèces situées dans une niche écologique proche. En Europe ne se trouve qu'une seule autre espèce de frelon, le frelon Européen *V. crabro* (Archer 1994). Ce frelon est considéré par beaucoup comme étant un auxiliaire de culture, menacé et donc protégé dans certains pays d'Europe, comme en Allemagne (Erlandson 1988). Les colonies de *V. crabro* sont plus petites que celles de *V. velutina*, environ 1000 individus produits contre 6000 à 15 000 respectivement (Nadolski 2012, Villemant *et al.* 2011, Rome *et al.* 2011). *Vespa velutina* est également invasif en Corée (Kim *et al.* 2006), où il a progressivement remplacé toutes les autres espèces de frelons (9 autres espèces) en zones urbaines (Choi *et al.* 2012). La compétition entre *V. crabro* et *V. velutina* en Europe a été évaluée comme étant non négligeable entre autre dans des zones de transition entre milieu rural et urbain, où les deux espèces se retrouvent (Monceau *et al.* 2015a). *Vespa crabro* positionne ses nids dans des sites fermés,

³ Espèce clé de voûte : Espèce dont la disparition compromettrait la structure et le fonctionnement d'un écosystème. Elle est caractérisée par la qualité, le nombre et l'importance des liens entretenus avec cet écosystème.

et *V. velutina* dans des endroits à la fois ouverts et fermés. Les fondatrices de *V. velutina* sont plus performantes pour différents comportements liés à l'initiation des colonies, comme l'exploration, l'intrépidité et l'agressivité (Monceau *et al.* 2015b). Dans l'Axe 1, nous allons donc comparer certains traits reproductifs entre les fondatrices de ces deux espèces, afin d'évaluer la part de ces paramètres dans cette compétition interspécifique.

Aucun cas d'hybridation avec *V. crabro* n'a été signalé suite à l'invasion de *V. velutina*, mais même s'il est très peu probable, ce risque pourrait exister suite à l'évolution potentielle de cet insecte invasif dans son aire d'introduction (Bermond 2014). De plus, *V. velutina* aurait pu être vecteur de parasites et de maladies d'Asie, qui auraient pu avoir de graves conséquences sur les vespides de son aire d'introduction. A l'inverse, *V. velutina* semble profiter d'un temps de répit dans « la course à l'adaptation »⁴ avec les parasites et les maladies Européenne, ce qui pourrait expliquer en partie sa pullulation actuelle (Torchin *et al.* 2003). Dans l'Axe 3 nous explorons cet aspect avec la recherche d'agents de biocontrôle entomopathogènes natifs.

⁴ **Hypothèse de la reine rouge** : les espèces sont en perpétuelle évolution pour leur survie, suite aux évolutions des communautés d'espèces avec lesquelles elles coévoluent (van Valen 1973)

2 Biologie de *Vespa velutina*

2.1 Cycle de développement

Les frelons sont des insectes eusociaux⁵ qui peuvent avoir des cycles de développement allant de 4 mois (*V. tropica* par exemple) à 8 mois (*V. simillima* par exemple) : *V. velutina* se trouve dans la dernière catégorie, son cycle allant de Mars à Novembre en Europe (Figure 4.A). Bien que le potentiel invasif des *Vespidae* et des frelons soit connu depuis longtemps (Spradbery 1973), on peut être surpris par la disproportion entre les capacités invasives de *V. velutina* et le peu de connaissances actuelles sur la biologie et l'écologie de cette espèce.

2.1.1 Pré-émergence, période solitaire

Après une courte période d'alimentation, (sève, nectar, miellat), de durée inconnue chez *V. velutina*, la future fondatrice va partir plus ou moins loin de son site d'hibernation suivant les espèces, pour chercher un site où installer son nid (cette distance est encore inconnue chez *V. velutina*, mais chez certaines espèces, on observe même une migration des reines sur plusieurs dizaines de km). La période de recherche de site de nidification se fait de fin Avril à début juin suivant les espèces de frelons (Matsuura & Yamane 1990), et *V. velutina* semblerait être plutôt précoce (Figure 4.A). Les ovaires de la future reine effectuent leur maturation durant cette période, pour lui permettre de pondre ses œufs une fois son site de nidification trouvé (chez *V. mandarinia* : Makino 2016). Nous avons approfondi cette question en comparant l'évolution de la maturation ovarienne des reines de *V. velutina* à celle de *V. crabro* durant cette période dans l'Axe 1.

⁵ Eusocialité = coopération entre les adultes pour prendre soin des jeunes, division du travail selon le statut reproducteur dans la colonie (différentiation entre reproducteurs (reines) et individus plus ou moins stériles (ouvrières)), coexistence de 2 générations d'adultes ou plus participant au travail de la colonie (Wilson 1971, Oster & Wilson 1978).

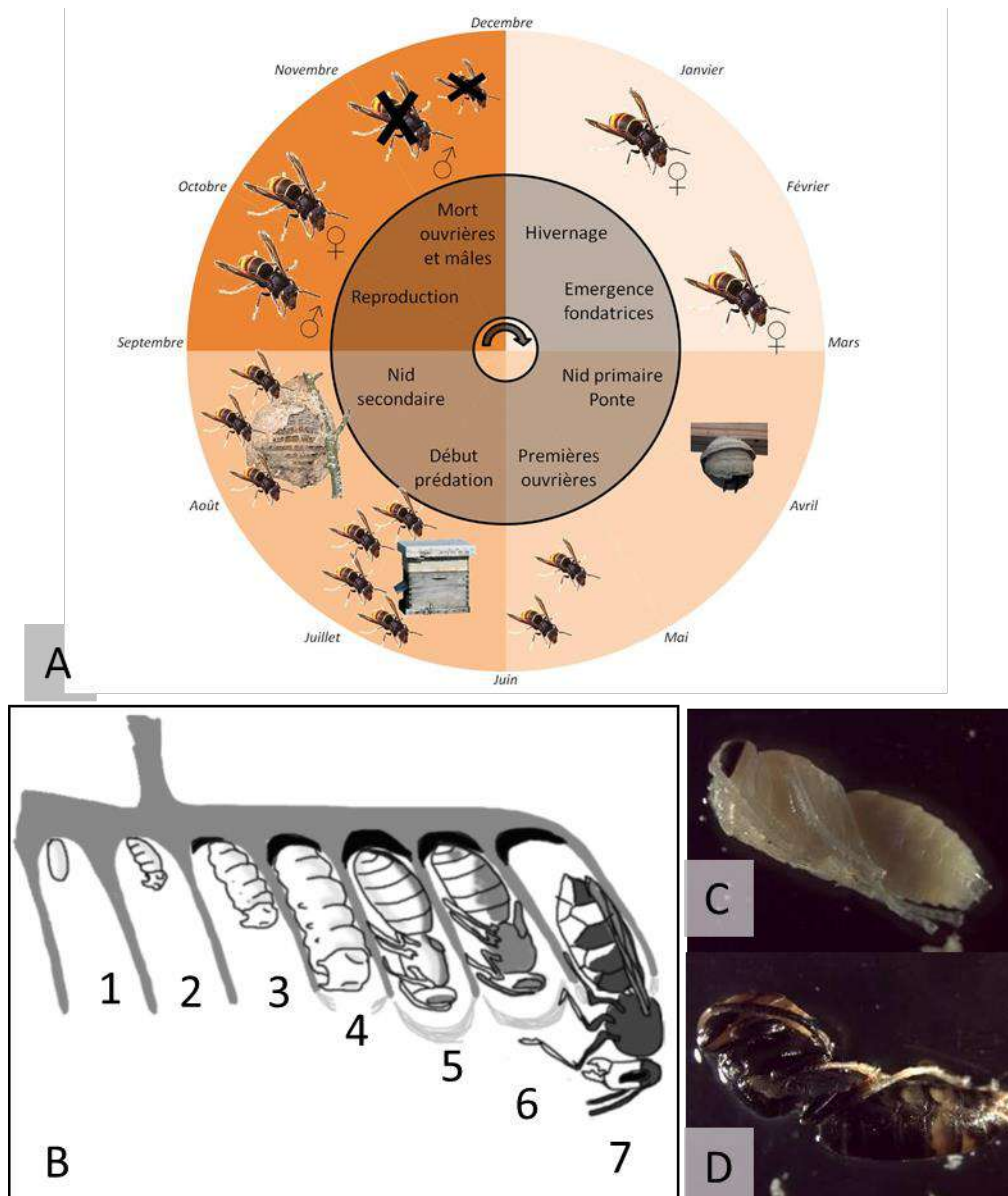


Figure 4 : A : cycle de développement de *Vespa velutina*. (Source : INRA, K. Monceau, D. Thiéry). B : Les différents stades de développement du frelon (environ 4-5 semaines de l'œuf à l'adulte): œuf (1), larves (2-3-4), nymphes (5-6) et imago (7) (Dessins, J. Poidatz). C : pupa blanche et D : pupa mélanisée (Photo, J. Poidatz).

La future reine de frelon fonde seule une colonie (haplométrie), construisant un nid primaire dans lequel elle pond ses œufs et élève ses premières larves d'ouvrières. Lors de l'initiation de la colonie, la reine se charge de toutes les activités : ponte, construction et défense du nid, collecte de ressources à la fois pour bâtir son nid, pour nourrir ses larves et se nourrir elle-même. Les larves de frelons se maintiennent dans les galettes du nid grâce à des bourrelets différenciés sur leur corps (pour plus de

détails sur la morphologie des larves de *Vespidæ*, voir [Yamane 1976](#)). Une fois leur taille maximum atteinte, environ 3 semaines après la ponte à 28°C ([J. Poidatz, pers obs.](#)), ces larves tissent un couvercle de soie au-dessus de leur tête pour ensuite commencer leur métamorphose ([Figure 4.B](#)). Les nymphes sont tout d'abord de couleur crème comme les larves, puis les pattes se différencient, les bourgeons alaires se développent et la cuticule se colore ([Figure 4.C, D](#)). Enfin, l'imago⁶ grignote le couvercle de sa cellule et émerge, parfois aidé par d'autres ouvrières. La métamorphose dure généralement deux semaines chez les frelons ([Martin 1991](#)), et nos observations préliminaires à 30°C en laboratoire ont confirmé ce chiffre chez *V. velutina* ([J. Poidatz pers obs.](#)).

2.1.2 Période coopérative

Cette période s'étend de l'émergence des premières ouvrières, jusqu'à la cessation complète d'activités extra-nidales de la reine (environ 3 mois). En effet, le rôle de cette dernière va évoluer avec la croissance de la colonie. Chez les cinq espèces de frelons étudiés par [Matsuura & Yamane 1990](#) (*V. Crabro*, *V. mandarinia*, *V. simillima*, *V. tropica* & *V. analis*), le degré de division du travail entre reines et ouvrières, une fois celles-ci émergées, varie avec la taille de leurs colonies. Plus la colonie est peuplée, plus la reine laissera vite la main aux ouvrières pour la collecte de ressource, pour ne se consacrer essentiellement qu'à la ponte (20 à 40 jours après émergence des ouvrières). On ne connaît pour le moment pas ces informations concernant *V. velutina*. Pendant cette période de croissance lente de la colonie, la reine peut pondre à nouveau dans les mêmes cellules une voir deux fois. L'organisation du couvain chez les frelons se fait en cercles concentriques de même stades, liés à la dynamique de développement des individus, et à celle de ponte de la reine ([Makino & Yamane 1997](#), [Martin 1991](#)). Parfois, dans le cas de manque de place, de nourriture ou d'eau, la colonie pourra déménager dans un nid secondaire, localisé dans un site plus propice à son développement ([Matsuura 1991](#)).

⁶ Imago = adulte chez les insectes

2.1.3 Période polyéthique de développement

Cette période de développement est caractérisée par une forte augmentation du nombre d'ouvrières et de la taille de la colonie, ainsi qu'une totale séparation des activités entre la reine (ponte) et les ouvrières (collecte de ressource, entretien de la colonie). Suite au fort agrandissement du nid, la reine ne fait plus que pondre, et ne participe plus aux activités extra-nidales. Elle n'a plus le temps de remplir les anciennes cellules, et se concentre alors à pondre dans les nouveaux étages (ex [Martin 1992](#) sur *Vespa affinis*). Dans ce dernier tiers du cycle de la colonie, des cellules plus larges sont en théorie construites, pour y élever des mâles et des nouvelles reines. Chez *V. velutina*, les reines, mâles et ouvrières sont de tailles très similaires en fin d'Automne ([Perrard et al. 2012](#)), et la taille des cellules n'a pour l'instant pas encore été mise en relation avec la caste.

2.1.4 Période reproductive

Durant cette période finale, la fondatrice meurt, les individus sexués émergent, se font nourrir par les ouvrières et consomment des exsudats larvaires, puis quittent le nid pour se reproduire. Les conditions et caractéristiques de ce comportement reproductif chez *V. velutina* sont encore inconnues, et nous allons tenter d'enrichir ce domaine de connaissance dans l'**Axe 1.3**. Le reste de la colonie périclote ensuite rapidement (de septembre à novembre). Ne recevant plus la nourriture des ouvrières, trop occupées à nourrir les reproducteurs, et voyant leurs sécrétions salivaires exploitées par ces derniers, les dernières larves sont prostrées et meurent peu à peu ([Spradbery 1978](#), [Matsuura 1991](#)). Les modalités de distribution de nourriture au sein des colonies suivant leur structure sociale sont des éléments primordiaux pour la compréhension de la biologie des colonies, et restent peu connues chez les frelons de manière générale : ce sera l'objet d'une importante partie de l'**Axe 2** de ces travaux de thèse.

Seules les jeunes reines hibernent, souvent dans des souches de bois mort, dans le sol ou autre refuge, jusqu'au printemps suivant. Le reste des individus de la colonie périclitera en cette période, plus ou moins rapidement suivant le climat et l'abondance de ressources disponibles pour leur survie.

2.2 Généralités sur les reproducteurs chez *V. velutina*

Les femelles de *V. velutina* se distinguent assez facilement des mâles grâce à un dimorphisme chez cette espèce au niveau (1) de l'abdomen : extrémité de l'abdomen pointu et brun, pourvu d'un dard chez les femelles (Figure 5.C), plus carré et agrémenté de deux petites taches jaunes sur la face ventrale du dernier tergite chez le mâle (Figure 5.B), (2) des antennes : plus longues d'un segment chez les mâles (Edwards 1980) (Figure 5.A), (3) des ailes : plus étroites chez les mâles et avec une nervation proche entre mâles et ouvrières, distincte de celle des reines (Perrard 2012). Les mâles de frelons en général n'ont été que peu étudiés dans la littérature. Leur fertilité et leur maturation sexuelle sont des domaines de connaissance que nous nous attacherons à traiter dans l'Axe 1 et dans l'Article 1.

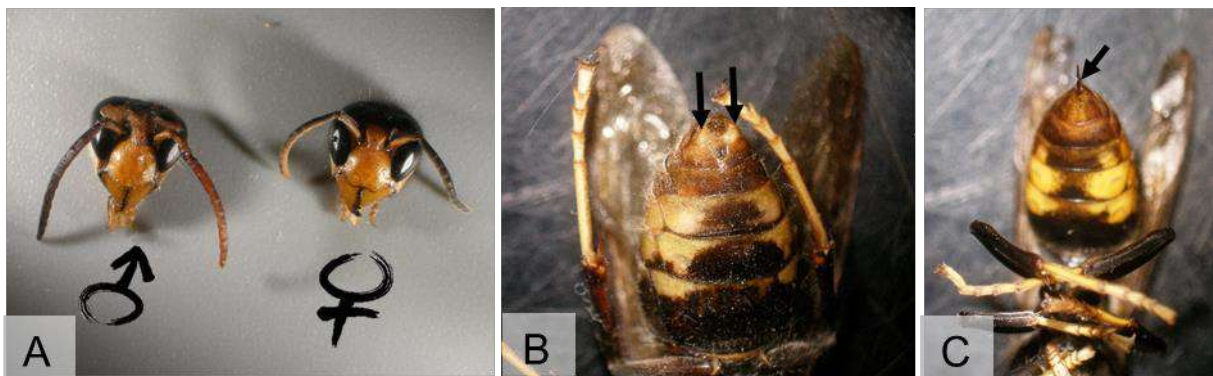


Figure 5 : Dimorphisme sexuel chez *Vespa velutina*. A : têtes de mâle (gauche) et d'ouvrière (droite) de *V. velutina*. B : vue ventrale de l'abdomen d'un mâle de *V. velutina*. Les flèches indiquent l'emplacement des deux petites taches caractéristiques chez ce sexe. C : vue ventrale de l'abdomen d'une ouvrière de *V. velutina*. L'abdomen est pointu et ici le dard est visible (flèche). (Photos J. Poidatz).

Les critères de poids et de taille ne sont pas suffisamment fiables pour distinguer ouvrières et reine, à cause du polymorphisme inter individuel parfois important. La taille moyenne des individus augmente tout au long de l'année (Perrard *et al.* 2012). A l'automne, seules des différences au niveau des proportions de certaines longueurs de nervures alaires permettent alors de distinguer les gynes (nouvelles reines) des ouvrières (Perrard 2012). Le poids avant hibernation ne peut être qu'un facteur

indicatif pour discriminer gynes⁷ et ouvrières en comparaison avec les autres individus de la même colonie, avec un petit recouvrement (Rome *et al.* 2015). Reines et ouvrières possèdent des ovaires avec un nombre similaire d'ovarioles, ainsi qu'une spermathèque (voir Axe 1 pour plus de détails). La présence d'œufs dans les ovaires en fin d'automne n'est pas non plus un critère de caste : les reines mères sont pour la plupart mortes à ce moment, permettant à certaines ouvrières de leur colonie de développer leurs ovaires (Spradbery 1973), et de pondre des œufs non fécondés (haploïdes), qui pourront donner naissance à des mâles (Foster & Ratnieks 2000).

Cependant, on peut différencier les futures reines des ouvrières par leur masse adipeuse abdominale. En effet, une forte quantité de corps gras dans l'abdomen à l'automne est caractéristique d'une femelle potentiellement reproductrice et prête pour l'hibernation.

2.3 Le nid de *V. velutina*

Comme chez la plupart des frelons, les nids de *V. velutina* sont constitués de pâte de bois mâchée (Nakamura & Sonthichai 2004). La fondatrice construit son nid primaire en commençant par le pédicelle de fixation, puis une douzaine de cellules sur une première galette (que l'on retrouvera donc en haut du nid mature), qu'elle entoure ensuite d'une enveloppe extérieure sphérique (Figure 6.A,B). Avec l'émergence des ouvrières, le nid sera agrandi et renforcé. Le nid de *V. velutina* est fermé, avec seulement une entrée étroite située d'abord sous le nid puis rapidement sur le côté du nid, contrairement à celui de *V. crabro* dont l'entrée est très large et se situe sous le nid tout au long de son cycle. Un nid mature en fin de cycle contient en moyenne 8 galettes de diamètres croissant vers le bas du nid, ce qui lui donne une forme d'œuf (Figure 6.C). Les galettes sont orientées horizontalement, quel que soit le support du nid (Figure 4.B). Des couches successives d'écailles de papier protectrices sont déposées les unes au-dessus des autres au sommet du nid (capuchon) ce qui améliore l'isolation du nid, son étanchéité et sa solidité en particulier pour son accroissement pondéral (Figure 6.C).

⁷ Gyne : femelle reproductrice encore vierge

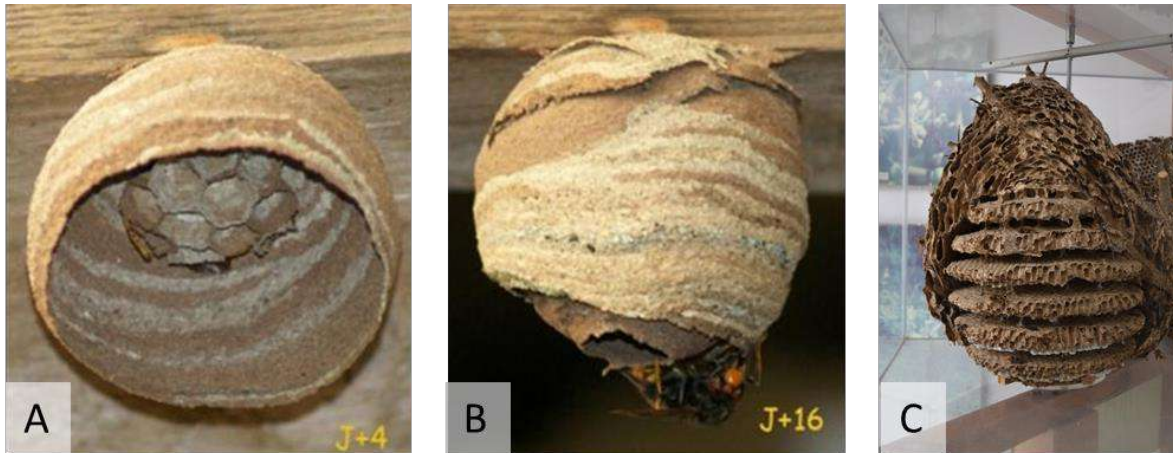


Figure 6 : Nids de *Vespa velutina*. A, B : nid primaire de 4 et 16 jours respectivement (source Fredon-bretagne.com), C : nid mature (récolté en hiver 2014) dont l'enveloppe extérieure a été retirée sur la moitié. La partie interne comprenant les galettes qui portent le couvain est donc visible (Photo J. Poidatz).

Les nids de *V. velutina* sont généralement construits dans des sites ouverts, contrairement à ceux de *V. crabro*, plus cryptiques. On les trouve souvent dans les feuillages des arbres ou des buissons, sous des hangars ou des avant-toits (Monceau *et al.* 2014a). Dans moins de 15% des cas ils peuvent s'installer dans des cavités au sol (Rome *et al.* 2011). Discrets, les nids de *V. velutina* sont rarement découverts avant d'avoir atteint une taille déjà imposante. Matsuura *et al.* 1990 ont rapporté que les colonies matures de *V. velutina* sont constituées de 1500 à 4500 cellules. Chaque cellule pourra être réutilisée une (partie haute du nid) à quatre fois (partie basse du nid) suivant la période et sa situation dans le nid (cf 2.1 de cette introduction).

2.4. Organisation sociale des colonies de *V. velutina*

Chez les frelons, les colonies sont monogynes (*i.e.* fondées par une seule reine), et n'essaient pas (Matsura *et al.* 1990). La durée de la vie des ouvrières dépend de l'espèce et de l'individu (~30.8 jrs chez *V. simillina*, 32.4 jrs chez *V. crabro*, 40.1 jrs chez *V. mandarinia* (Matsuura & Yamane 1990)). Elles exécutent diverses activités à la fois dans et hors de leur nid dès 2-3 jours après leur émergence. Aucune relation entre l'âge de l'ouvrière et son travail n'a pu être mis en évidence chez les 5 espèces de frelon étudiées par Yamane & Makino 1977 (*V. Crabro*, *V. mandarinia*, *V. simillima*, *V.*

tropica & *V. analis*), ni chez *V. orientalis* (Ishay *et al.* 1968), puisqu'elles continuent à collecter du matériel de construction, de l'eau et de la nourriture tout au long de leur vie. Chez *V. velutina*, les ouvrières ne sont pas encore capables de voler juste après leur émergence, mais elles effectueront en moyenne leurs premiers vols entre 24 et 48h plus tard à 23°C (J. Poidatz pers. obs.). Chez *V. velutina*, le rayon d'action des ouvrières autour de leur colonie et leur degré de spécialisation pour la récolte de certaines ressources, ainsi que la manière dont elles distribuent la nourriture qu'elles collectent dans leur colonie sont encore inconnus, et nous nous attacherons à décrire et comprendre ces comportements dans l'Axe 2.

Chez *V. velutina*, la **défense du nid** est assurée par les ouvrières les plus anciennes (Monceau *et al.* 2013a). Ces gardiennes, positionnées à l'entrée du nid, vérifient l'appartenance à la colonie et l'état sanitaire des individus rentrants (Matsuura 1991). Lors d'une agression, quelques gardiennes vont d'abord venir « tester » l'ennemi en le cognant, puis si ce dernier reste ou s'approche, un comportement de défense collectif pourra être observé : les ouvrières de frelons présentes à l'intérieur du nid vont sortir en masse, recouvrir le nid et faire vibrer leurs ailes, produisant ainsi un bruit impressionnant (O. Bonnard, J. Poidatz pers. obs.). Si la menace n'est toujours pas éliminée, l'ensemble des ouvrières disponibles, en alerte, va alors attaquer l'agresseur. Les ouvrières de frelons sont munies d'un dard lisse rétractile pouvant infliger de nombreuses piqures, et chez *V. velutina* elles sont également capables de projeter sur leurs ennemis par l'abdomen une substance irritante (H. Guisnel & J. Poidatz pers. Obs.). Même s'ils n'ont pas de dard, certains cas de défense du nid *in natura* par des mâles ont été observés chez une autre sous espèce de *V. velutina*, *pruthii*, au Pakistan (Perveen & Shah 2013) (pour plus de détails sur les mâles, voir l'Axe 1).

3 Etat des lieux des moyens de lutte contre *Vespa velutina*

En Europe, quelques cas naturels de prédatons ponctuelles de *V. velutina* par des oiseaux insectivores ont été recensés, ainsi que certains cas de parasitismes : un endoparasite *Conops vesicularis* (Conopidae) (Darrouzet *et al.* 2014), et un nématode *Pheromermis vesparum* (Villemant *et al.* 2015). *Vespa velutina* est également soumis ponctuellement à des infections par des virus : IAPV, *i.e.* Israeli Acute Paralysis Virus (Manley *et al.* 2015) et DWV, *i.e.* Deformed Wings Virus (A. Dalmon *in prep.*) Aucune application en lutte biologique n'a cependant pu être envisagée avec ces organismes, soit à cause de leur faible efficacité, soit à cause des spectres d'hôtes larges de ces parasites et de grande capacités dispersives ou de transfert, et donc des forts risques sur des insectes non-cibles, ou enfin à cause d'une inadaptation technique ou pratique à un potentiel usage en tant qu'agent de lutte biologique (processus de fabrication complexe, coût, technicité *etc.*). Dans l'Axe 3, nous explorerons le potentiel du développement de biocontrôle sur *V. velutina* par des champignons entomopathogènes, puisque qu'en plus d'isolats trouvés dans le sol, nous avons découvert une fondatrice de *V. velutina* naturellement parasitée par un champignon entomopathogène.

Après l'observation des premières attaques de *V. velutina* sur les ruches françaises, de nombreux moyens ont été mis en œuvre pour tenter de réduire l'impact de ce prédateur invasif, et nous allons dans cet état des lieux faire le bilan des techniques utilisées pour le contrôle de ce frelon jusqu'à présent.

3.1 Piégeages, captures de printemps

Comme développé en introduction, *V. velutina* a un cycle de développement annuel. Au printemps, les fondatrices sortent d'hibernation pour chercher un site adapté à l'initiation d'une colonie. Une des techniques les plus classiquement utilisées dans le but de diminuer le nombre de

colonies est alors le piégeage de ces futures reines à l'aide de pièges attractifs, ou des systèmes de capture (Figure 7).

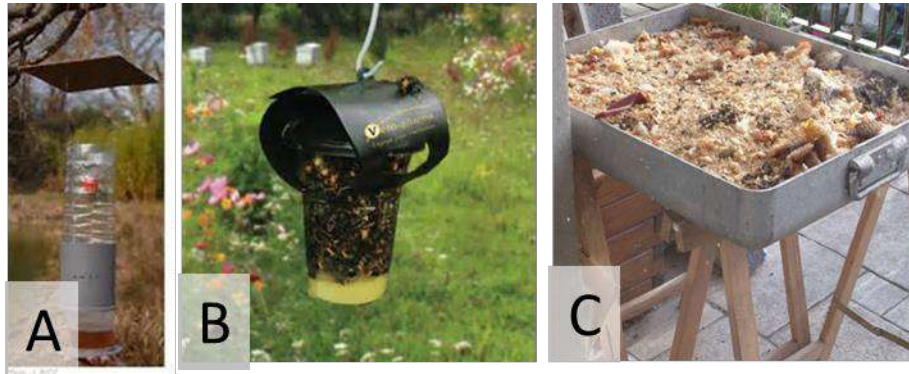


Figure 7 : A : Piège alimentaire à nasse avec des trous d'entrée et de sortie calibrés pour éviter autant que possible de piéger d'autres arthropodes que le frelon asiatique (développement par J. Blot, ADAAQ), B : piège Vétopharma (solution attractive, source wwwq.veto-pharma.fr), C : bac de capture préventif (AAFA, source : fiche technique BCP, 8/03/2017).

De nombreux pièges existent actuellement, tous inspirés du même principe, à savoir un principe de nasse ou un système de destruction (noyade ou électrocution) qui empêche l'individu capturé de ressortir. Même si ce piégeage de printemps semble être une méthode satisfaisante car limitant potentiellement l'inoculum de départ en fondatrices dans un lieu donné, il a malheureusement été montré qu'une très faible proportion de reines était capturée par ces moyens à l'échelle globale, et que cela n'affectait pas les populations ni la dynamique d'invasion, dans l'état actuel de son avancée en France (Beggs *et al.* 2011, Monceau *et al.* 2012). Une étude à grande échelle pour évaluer l'efficacité de cette stratégie de piégeage a tout de même été lancée en 2017 par l'ITSAP et le MNHN dans le Sud-Est de la France. Les bacs de capture n'ont quant à eux pas encore été testés scientifiquement. Nous manquons encore d'éléments pour évaluer l'intérêt de la capture de males pour empêcher leur accouplement avec des femelles, ainsi que pour évaluer la variabilité de fertilité des fondatrices au printemps : ce sont des leviers de recherche qui seront traités dans l'Axe 1 de ces travaux de thèse.

3.2 Protection des ruchers fin d'été-automne

Afin de protéger les ruches de manière plus directe de juillet à octobre, diverses techniques peuvent être mises en place, résumées dans le tableau ci-contre ([Tableau 1](#)). Leurs principes reposent soit sur le piégeage ou sur le fait de tuer des ouvrières de *V. velutina*, soit sur l'installation de barrières physiques ([Figure 8A et D](#)) entre ces chasseuses et leurs proies ([Figure 8B et C](#)).



Figure 8 : Exemple de systèmes de protection des ruchers anti-frelons. A. Harpes électriques (Photo culturevie.info.org), B. Filets (Photo Bizbizeco.org), C. Grilles (ecodouble.farmserv.org), D. Piège-tiroir à placer sous la ruche (Photo vita-europe.com).

Tableau 1 : Liste des différentes techniques de protection des ruchers contre les attaques de *V. velutina* actuellement utilisées.

Méthode	Lieu d'application	Principe	Inconvénients
Filet avec des mailles de 5mm	Autour du rucher	Isole les ruches des frelons, diminuant ainsi le stress des colonies d'abeilles.	Ce système déplace le problème : les frelons apprennent à attendre les abeilles sur leurs routes de vol préférentielles. Méthode non adaptable à de gros ruchers
Piège alimentaire	Près des ruches	Capture des frelons grâce à l'attractivité de l'appât utilisé pour diminuer la pression directe sur les ruchers.	Une étude de l'ITSAP datant de 2015 (D. Decante pers. Com. 2015) montre qu'avec les pièges actuels, on n'observe pas de différences sur la prédation des ruchers quels que soient les pièges utilisés (les pièges attireraient même apparemment plus de frelons sur les ruchers « protégés » que sur les témoins)
Tiroirs - pièges	Sous les ruches	Les frelons cherchant à rentrer dans les ruches se retrouvent coincés par un système de grilles et de nasse dans ce tiroir placé sous la ruche. Ce système est pratique à utiliser et à entretenir.	L'efficacité de ce système reste à prouver. La présence des frelons piégés sous leur colonie stresse potentiellement les ruches, en perpétuelle alerte. Ce système est coûteux à l'échelle d'un rucher
Harpes électriques	Entre les ruches	Electrocute les frelons au passage lors de leurs tours autour des ruches.	L'efficacité de ce système reste à prouver, et les dégâts collatéraux sur les abeilles et d'autres insectes doivent être évalués. La maintenance est complexe et couteuse à l'échelle d'un rucher (énergie, danger). Méthode non adaptable à de gros ruchers.
Grilles électriques	A l'entrée des ruches	Empêche le pillage des ruches par les frelons.	Déplace le problème, les frelons attendent juste un peu plus loin de la ruche. L'efficacité de ce système reste à prouver, et les dégâts collatéraux sur les abeilles et d'autres insectes doivent être évalués.

Certains apiculteurs dégagent leurs ruches des frelons à l'aide de raquettes (électrifiées ou non). Malheureusement ces méthodes ne peuvent s'appliquer qu'à des nombres réduits de ruches et leur efficacité n'a jamais réellement été mesurée et confrontée à d'autres méthodes. Les pièges alimentaires protéiques peuvent attirer plus ou moins d'ouvrières suivant le climat (Harris *et al.* 1991), et leur entretien est couteux.

La synthèse publiée par Beggs *et al.* (2011) atteste de l'inefficacité de ces méthodes de capture/chasse des ouvrières, testées sur de nombreuses autres espèces de *Vespidae* invasives. Cette inefficacité s'expliquerait par le peu d'impact sur la colonie en entier du retrait d'une proportion somme toute réduite de fourrageuses, la colonie pouvant compenser ces pertes (O'Donnel & Jeanne 1992, O'Donnel 1999, Beggs *et al.* 2011) pour plus de détails sur ce mécanisme et comment cet aspect a commencé à être étudié chez *V. velutina*, voir l'Axe 2 de ces travaux. Agir au niveau des collectrices, en tout cas dans ces proportions, ne semble pas être la solution à développer : il faudrait au contraire réussir à perturber la colonie dans son ensemble, comme proposé par Beggs *et al.* 2011 et Monceau *et al.* 2014a.

3.3 Lutte chimique et destruction des nids

Depuis le classement de *V. velutina* en espèce nuisible de 2eme catégorie (arrêté du 26 décembre 2012), la déclaration de la présence de nids est obligatoire et la destruction des nids doit être organisée par l'autorité régionale (Préfet/Préfette). La destruction des nids de *V. velutina* est une méthode de contrôle efficace : la colonie étant détruite dans son ensemble, les quelques ouvrières potentiellement survivantes n'ont plus de larves à nourrir, ce qui entraîne une réelle diminution de la pression sur les ruches précédemment attaquées par les ouvrières de cette colonie.

De nombreux insecticides sont utilisés contre *V. velutina*, avec des méthodes d'application dépendantes du nombre d'individus à détruire. A l'heure actuelle, les techniques de lutte autorisées à l'aide d'insecticides sont : (1) les bombes insecticides à grande portée (principalement à base de

pyréthrinoides : Trans-phénothrine, D Tetramethrine...), conseillées pour le traitement d'individus isolés ou de jeunes nids, (2) les poudres d'insecticides (principalement carbamates) et le dioxyde de soufre, utilisés avec une perche par les professionnels pour la destruction de nids déjà matures (Figure 9), avec obligation de décrocher et éliminer les nids pour limiter au maximum l'impact environnemental de ces traitements. Le traitement au SO₂ intoxique les individus et congèle le couvain grâce à la réaction exothermique dégagée. Contrairement aux autres insecticides, celle-ci a l'avantage de ne pas laisser de résidus toxiques dans l'environnement, mais son usage reste très irritant et aussi relativement toxique pour les destructeurs de nids ([H. Cuizel, destructeur de nids, pers. com.](#)). Toutefois, son interdiction par les réglementations européennes et française est attendue.

Actuellement la société Française 'DroneVolt' travaille à la mise au point d'un drone (adapté de leur modèle pour pulvérisation de peinture en conditions extrême) et utilisable en destruction de nid. De même, des pistolets à nid de frelon ([frelon.com](#) & DIPTER) proposent de tirer sur les nids avec des pistolets type « paintball » avec des capsules contenant de l'insecticide (1015VG DIPTER). Toutefois leur usage ne se montrera efficace à large échelle que lorsqu'on saura localiser efficacement et en grande quantité les nids. Il faudra ensuite et malgré tout les décrocher par la suite pour éviter une potentielle pollution de l'environnement par ces produits toxiques.



Figure 9 : Photos de destruction de nids de *Vespa velutina*. L'utilisation d'une nacelle (A, photo J. Poidatz) est courante pour ce genre d'opérations. Le traitement est injecté dans le nid depuis la nacelle ou le sol à l'aide d'une perche creuse télescopique (B, Photo A. Bloquet).

Les principales difficultés de la destruction directe des nids résident dans la **détection et dans l'accès aux nids** de frelons pour les détruire. En effet, bien souvent les nids des *V. velutina* sont très discrets et peu accessibles à cause de leur localisation (en haut des arbres, dans des buissons, dans des cavités, sous le sol (Monceau *et al.* 2014a)), parfois dans des zones naturelles, ou avec du relief. La détection des nids se fait actuellement à l'œil nu, par des associations d'apiculteurs ou de chasseurs, des responsables communaux, mais également par des particuliers. Malheureusement les nids sont principalement détectés en fin d'automne avec la chute des feuilles qui les camouflaient, de ce fait les reines et mâles qu'ils contenaient sont pour la plupart déjà libérés (jusqu'à 300 reproductrices par nid (Rome *et al.* 2015)). La répartition des nids de *V. velutina*, logiquement liée à leur impact potentiel, est également complexe à établir. D'une part à cause des nombreuses bases de données déjà existantes, ouvertes ou non, non croisées (INPN, AGIIR, données d'associations, de communes, d'entreprises, Bases de données de chaque pays), à la méconnaissance de cet insecte par le grand public (confusions fréquentes), mais aussi à cause d'un effet d'habitation des personnes dans des zones envahies depuis plusieurs années, qui ne les signalent plus. Des projets sont en cours pour utiliser des drones

embarquant une caméra thermique ou encore un sonar, afin d'augmenter les chances de détection (Coloss Turin 2016).

Le coût de la destruction des nids est également problématique : il est estimé en moyenne à 110€ par nid, bien que certaines entreprises spécialisées le facturent à plus de 300€ (Monceau *et al.* 2014a). De telles opérations nécessitent en effet à la fois de l'organisation, de la communication, du matériel, et du temps pour préparer, repérer et opérer. A cela s'ajoute le danger lors de l'opération (opération nocturne favorisée, manipulation de produits toxiques, risques de piqûres, de chutes etc...) (Figure 9).

Certains apiculteurs testent des applications d'insecticides non autorisés (fipronil, imidaclopride...) sur des ouvrières de *V. velutina* qu'ils relâchent une fois traitées en vue d'intoxiquer des nids. Cette technique, bien qu'attirante, soulève la vraie question du devenir de ces insecticides dans la nature (les nids non localisés ne pouvant pas être éliminés après traitement) et de leur impact sur l'environnement avec un usage pour lequel ils n'ont pas été évalués auprès de l'ANSES⁸. En effet, de plus en plus d'études mettent en évidence des effets néfastes des insecticides, des applications directes ou chroniques de certaines de ces molécules ayant des impacts sur de nombreux organismes plus ou moins complexes, dans tous les compartiments environnementaux (Galiulin *et al.* 2002, Angulo Lucena *et al.* 2007) (air, sol, eau (Gerecke *et al.* 2002, Salamova *et al.* 2013)), organismes vivants (exemple dans des oiseaux (Tao *et al.* 2009), poissons (Krzeminski *et al.* 1977, Jackson *et al.* 2009), insectes (Suchail *et al.* 2001) ou encore des plantes (Tao *et al.* 2005)).

La désorganisation des colonies *via* leur ouvrières est cependant selon nous l'une des techniques les plus prometteuses pour lutter contre *V. velutina*, comme montré dans Beggs *et al.* 2011 sur des guêpes invasives en Nouvelle Zélande (technique du Cheval de Troie : pour plus de détails là-dessus voir Axe 3), **mais** il faut mettre en place une lutte raisonnée et limiter les risques sur l'environnement. L'impact environnemental de ces solutions devra être étudié, évalué, de façon stricte, qu'il s'agisse de solutions insecticides avec des risques d'intoxication. L'implication de nombreux résidus dans des problématiques diverses a été prouvée de multiples fois (allergies (Kwak *et al.* 2009), effets

⁸ Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire

cancérogènes (Dich *et al.* 1997), pathologies (exemple chez des poissons (Rojik *et al.* 1983)), troubles hormonaux par perturbation endocrine (Leblanc *et al.* 1997, McKinlay *et al.* 2008, Mostafalou & Abdollahi 2013), effets neurotoxiques (Alavanja *et al.* 2004), érosion de la fertilité (Whorton *et al.* 1977, Elbetieha *et al.* 2001) et du système immunitaire (Corsini *et al.* 2008), sans compter des effets tératogènes, c. a. d. une malformation des embryons (Martson & Voronina 1976, Weiss 1997, Ray & Richards 2001), et mutagènes.)) ou de solution de biocontrôle avec le risque de dissémination des organismes et de leur non spécificité. Ces études font partie intégrante des dossiers d'autorisation de mise sur le marché des biocides.

Une meilleure compréhension des colonies de *V. velutina*, allant de leur initiation (**Axe 1**) jusqu'à leur fonctionnement global (**Axe 2**), sera donc l'objectif de ces travaux de thèse, avec comme but final le développement de stratégies de lutte efficaces et durables (**Axe 3**).

4 Objectifs et structure de la thèse

L'objectif de ces travaux de recherche est d'augmenter nos connaissances sur la biologie de *V. velutina* afin de permettre de développer des techniques de contrôle durables axées sur la perturbation de la colonie. Chaque Axe sera structuré autour d'une introduction bibliographique et les résultats seront présentés sous forme soit de publications acceptées, soumises ou en préparation. Les résultats faisant partie d'expérimentations préliminaires seront quant à eux proposés en annexe de cette thèse.

4.1 Présentation des axes de la thèse

Le premier axe portera sur les travaux effectués autour de la biologie des reproducteurs de *V. velutina* à différents moments clés de son cycle de développement : au moment de la **reproduction** (maturation sexuelle des mâles, comportement de reproduction des couples) et en **sortie d'hibernation** : les caractéristiques reproductives et de dispersion des fondatrices suivant les régions et les espèces seront alors étudiées.

Le deuxième axe portera sur l'étude de certains paramètres liés à la biologie de la colonie de *Vespa velutina*, utiles à connaître pour la mise en place d'une technique de contrôle de type Cheval de Troie : tout d'abord en caractérisant la potentielle spécification des ouvrières pour la collecte de certains types de denrées, puis en quantifiant les flux de nourritures suivant le stade de développement du nid, enfin en explorant leur rayon d'action autour de leur nid ainsi que leur rythme d'activité.

Le **troisième axe** portera essentiellement sur les méthodes de lutte potentiellement applicables au frelon asiatique, en explorant plus particulièrement la piste d'une lutte biologique avec l'utilisation de champignons entomopathogènes.

Chaque axe est agrémenté de discussions liées aux articles qui y sont associés et d'annexes comprenant certaines expérimentations non publiées. A la fin de ce travail de thèse se trouve une

discussion générale axée sur les avancées et les perspectives de recherches engendrées. Enfin, une conclusion générale reviendra sur l'ensemble de ces travaux dans un contexte plus large, et proposera des pistes de recherche intéressantes aux vues des avancées réalisées. Pour plus de clarté et afin d'éviter les redondances dans ces travaux, au lieu de garder les références associées à chaque article dans le corps de texte, nous avons choisi d'homogénéiser la liste de références bibliographique à la fin de ce manuscrit.

4.2 Formulation des hypothèses de recherche sur lesquelles repose cette thèse

Axe 1 : Biologie des reproducteurs de *V. velutina*

- Les mâles d'hyménoptères présentent un potentiel reproducteur variable dans le temps, avec une durée de maturation sexuelle particulière. Suivant les espèces d'hyménoptères, le processus de maturation sexuelle est plus ou moins tardif et implique une spermatogenèse continue ou synchrone (Boomsma *et al.* 2005). Suivant la période d'émergence, le potentiel reproducteur des mâles de *V. velutina*, à définir, pourrait varier, comme par exemple chez *Bombus terrestris* (Baer 2003). **Application : évaluer l'intérêt d'un contrôle des mâles de *V. velutina*. Article publié:** Poidatz, J., Bressac, C., Bonnard, O. & Thiéry, D. (fév.2017) Delayed sexual maturity in males of *Vespa velutina*. *Insect Science*, 1-11. DOI: 10.1111/1744-7917.12452
- Les fondatrices de *V. velutina* pourraient avoir des caractéristiques reproductives optimisées comparées à celles de *V. crabro* qui expliqueraient leur succès invasif, de la même manière que chez les fourmis invasives vs natives décrites dans Suarez *et al.* 1999. **Application : évaluer l'intérêt d'un contrôle des fondatrices et la potentielle compétition avec *V. crabro* durant cette période critique. Manuscrit soumis à Journal of Insect Physiology (septembre 2017)** Poidatz, J., Bressac, C., Bonnard, O. & Thiéry, D. Compared reproductive traits of foundresses in a native and an invasive hornet in Europe.

- L'hypothèse du « Spatial sorting », *i.e.* une évolution morphologique en faveur de caractères plus dispersant sur les fronts d'invasion, pourrait avoir eu lieu chez *V. velutina* durant son expansion en Europe, comme démontré par exemple chez la coccinelle invasive *Harmonia axyridis* (Lombaert *et al.* 2014). **Application : mettre en évidence des caractéristiques de dispersion différentes suivant les régions et en tirer des implications pour un monitoring optimisé de *V. velutina*.** *Sélection spatiale chez *Vespa velutina* : Annexe 1.1 : Compromis entre traits dispersifs et reproductifs chez les fondatrices de *V. velutina* entre la Bretagne, l'Italie et le Bordelais. Annexe 1.2 : Projet EUROFRELO : Evaluation d'une potentielle sélection spatiale chez *V. velutina* en Europe.*
- Le comportement de reproduction de *V. velutina* pourrait dépendre du lieu (nid, site de nutrition) comme par exemple chez *V. crabro* ou *V. mandarinia* qui se reproduisent dans le premier cas dans des sites de ravitaillement et dans le deuxième cas près des nids. Cela pourrait également dépendre de l'âge des partenaires et de leur origine (Alcock *et al.* 1978). **Application : trouver des éléments supplémentaires pour savoir où / comment perturber la reproduction de *V. velutina*.** *Annexe 1.3 : Describing the mating behavior of *Vespa Velutina*, in laboratory conditions.*

Axe 2 : De la collecte à l'utilisation des ressources chez *V. velutina*

- Les ouvrières de *V. velutina* pourraient avoir un niveau de spécialisation plus élevé que la plupart des autres vespides, lié au fort niveau de population des colonies de cette espèce, et pourraient collecter un certain type de ressources préférentiellement, comme par exemple chez *Polybia occidentalis* (O'Donnell & Jeanne 1990), *Metapolybia* spp. et *Protopolybia exigua* (Simões 1977, Forsyth 1978, Karsai & Wenzel 2000). **Application : évaluer l'intérêt respectif des appâts multiples ou uniques pour attirer des ouvrières de *V. velutina*.** *Annexe 2.1. Evaluation de la spécialisation pour la collecte d'un type de nourriture chez les ouvrières de *Vespa velutina*.*

- Les ouvrières de *V. velutina* pourraient distribuer leur ressources protéiques et sucrées différemment à la colonie suivant les âges et le sexe des individus de la colonie, comme vu chez les fourmis par Markin en 1970, Bonavita – Cougourdan & Passera en 1978, ou encore par Cassill & Tschinkel 1995. Le nombre d'individus en contact avec l'ouvrière distributrice pourrait se rapprocher de celui observé chez *V. orientalis* par Ishay & Ikan en 1968
Application : évaluation de la répartition potentielle d'agents de régulation pouvant être utilisés dans une stratégie de type 'Cheval de Troie', suivant l'organisation sociale des colonies. Manuscrit en cours de rédaction, pour soumission dans Animal Behaviour: Poidatz, J., Bonnard, O. & Thiéry, D. Titre non définitif : Studying food distribution inside Vespa velutina nests using heavy metal tracers.
- Les ouvrières de frelon asiatique devraient être capables de retrouver leur colonie jusqu'à une certaine distance après transport à l'aveugle. Cette distance pourrait être comprise entre 500m comme chez *V. orientalis* (Ugolini et al. 1987) et 8km comme chez *V. mandarinia* (Matsuura & Sakagami 1973)
Application : estimer le rayon où chercher les colonies de V. velutina après l'observation d'ouvrières, modéliser son impact. L'activité des ouvrières au nid pourrait varier avec la luminosité et la température, comme vu chez *V. orientalis* (Ishay & Kirshboim 2000). La durée de leurs voyages pourrait varier avec l'âge des ouvrières comme chez *V. simillima* ou *V. analis* (Jeanne & Taylor 2009), mais également avec la température et la luminosité (Ishay & Kirshboim 2000).
Application : déterminer un timing de destruction des colonies le plus optimal, que cela soit par rapport aux conditions climatiques ou à l'heure dans la journée. Manuscrit soumis (28/08/2017), en cours de révision dans Journal of Pest Science : Poidatz, J., Monceau, K., Bonnard, O. & Thiéry, D. Homing behaviour in an invasive bee predator.

Axe 3: Vers un biocontrôle des colonies de *V. velutina* ?

- Des champignons natifs généralistes pourraient commencer à attaquer naturellement le frelon asiatique. **Shortnote en cours de rédaction, soumis le 21/12/2017 à Journal of Invertebrate Pathology.** Poidatz, J., Javez-Lopez Plantey R. & Thiery D. Description of a strain of *Beauveria b.* naturally parasitizing the bee predator *Vespa velutina* in France
- Certains insecticides perturbateurs de développement pourraient avoir un impact intéressant sur le couvain du frelon asiatique. **Annexe 3.1. : Evaluation de l'efficacité de molécules insecticides et de champignons entomopathogènes sur les larves de *Vespa velutina*.**
- La lutte biologique pourrait potentiellement être intéressante pour lutter contre le frelon asiatique grâce à l'usage de champignons entomopathogènes, comme démontré chez *V. vulgaris* par Harris *et al.* 2000. **Application : le développement de méthodes de lutte biologique contre *V. velutina*.** **Manuscript accepté avec modifications mineures, chez Journal of Invertebrate Pathology (2/01/2018):** Poidatz J., Javez-Lopez Plantey R. & Thiery D. Indigenous strains of *Beauveria* and *Metharizium* as potential biological control agents against the invasive hornet *Vespa velutina*.

AXE 1 : Etude de la biologie de la reproduction chez *Vespa velutina*.

Comme présenté en introduction, un moyen pour limiter le nombre de colonies d'un insecte social est de perturber sa reproduction ou l'initiation de sa colonie. Peu de choses sont connues chez les reproducteurs de *V. velutina*, *i. e.* les mâles et les femelles reproductrices : c'est un verrou de connaissances qui a reçu très peu de travaux et que nous nous attacherons à explorer dans ce premier axe. Ce volet portera sur la biologie, la physiologie et le comportement des reproducteurs de *V. velutina*. Nous traiterons (1) des mâles et de leur maturation sexuelle, (2) de la biologie des fondatrices suivant l'espèce (*V. velutina* vs *V. crabro*) et suivant le lieu de capture, et de (3) l'accouplement chez *V. velutina*.



Mâle de *V. velutina* émergeant de sa cellule (Photo J. Poidatz)

A.1. Physiologie des mâles de *Vespa velutina*

A.1.1 Généralités sur les mâles d'hyménoptères.

Comparé à la quantité énorme d'études se rapportant aux femelles des hyménoptères dans la littérature, peu de travaux ont été faits sur la physiologie des mâles. Les principaux mâles ayant été étudiés sont ceux des fourmis (Wheeler & Krutzsch 1992), et des abeilles (Cruz-Landim *et al.* 1980, Cruz-Landim 2001, Moors *et al.* 2005, (*Apis mellifera*), Araujo *et al.* 2005, Mônica *et al.* 2005, Velthuis *et al.* 2005 (abeilles mélipones), Gracielle *et al.* 2009 (Megalichilinae)). La physiologie des mâles de quelques guêpes a également été étudiée : chez *Ancistrocerus antilope* (Eumeninae) (Bushrow *et al.* 2006), chez des polistes (Wenzel 1987, Beani *et al.* 2014), ainsi que chez *Pegoscapus* (Chalcidoidea) (Fiorillo *et al.* 2008) et *Fopius arisanus* (Braconidae) (Quimio & Walter 2000). Mais, la physiologie reproductrice d'aucun mâle d'une espèce de frelons n'avait jusqu'à présent été étudiée.

Comme nous l'avons vu en introduction, la très grande majorité des mâles de *V. velutina* sont produits en automne, en même temps que les gynes, mais en fin de printemps 2015, nous avons trouvé de nombreux mâles dans les nids collectés *in natura* (>50% de la population). Des mâles précoces ont déjà été observés chez cette espèce (Arca *et al.* 2012, Monceau *et al.* 2013a, Darrouzet *et al.* 2015), et au-delà de la raison de la présence de mâles précoces (point qui sera traité en A.2.3), nous avons voulu comparer ici la maturation sexuelle et les capacités reproductrices de ces deux types de mâles.

Chez les *Vespidae* la production de mâles a parfois été considérée par certains auteurs comme une production parasite (Montagner 1964, Spradbery 1973). Ils étaient décrits comme étant incapables de participer aux tâches majeures de la colonie (collecte et distribution des ressources ou construction ou défense du nid). De plus, pour faire leurs réserves glucidiques avant le vol nuptial, les mâles réquisitionnent de la nourriture auprès des larves (exsudats) et des ouvrières de la colonie : par exemple l'augmentation de poids des mâles observée chez *V. affinis* avant de quitter leur nid est de 38%, Martin 1993. Puis les mâles sont dans la plupart des espèces de vespides chassés de la colonie par les ouvrières. Ainsi des comportements agonistiques de la part des ouvrières de *V. velutina* envers les mâles ont déjà été observés en captivité (Monceau *et al.* 2013a). Mais le rôle des mâles dans les colonies de vespides est de plus en plus discuté et controversé, et semble être plus complexe. Ainsi

Axe 1

chez *Polistes chinensis*, un rôle social des mâles après l'émergence a été mis en évidence (Kasuya 1983). Chez les mâles de *V. velutina pruthii*, présent naturellement au Pakistan (Perrard *et al.* 2014), Perveen & Shah décrivent en 2013 leur capacité à défendre la colonie. De plus, Couto *et al.* 2016 ont mis en évidence une morphologie du cerveau particulière chez les mâles de *V. velutina var nigrithorax*, assez proche de celui des ouvrières de cette espèce. L'étude de la physiologie de reproduction des mâles de *V. velutina* apportera des éléments supplémentaires dans la compréhension de la complexité de cette caste.

A.1.2 Organisation du tractus reproducteur mâle.

La période de maturité des mâles pour la reproduction ainsi que la quantité de spermatozoïdes produits sont des paramètres essentiels pour comprendre leurs capacités reproductrices. Le tractus des mâles de *V. velutina* est organisé comme suit (Figure 10). Les vésicules séminales contiennent les spermatozoïdes prêts à être transférés à la femelle lors d'un accouplement.

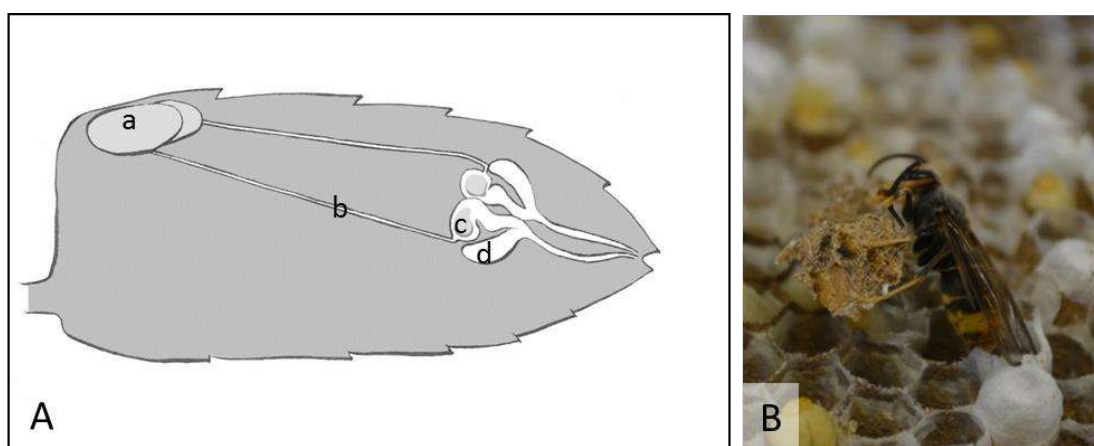


Figure 10 : A : coupe longitudinale de l'abdomen et schéma du tractus reproductif d'un mâle de *V. velutina*, B : émergence d'un mâle de cette même espèce. a : testicules, b : vase déférent, c : vésicules séminales, d : glandes séminales (Schéma et photo J. Poidatz).

Lors de l'étude de la production spermatique d'un mâle, les vésicules séminales sont isolées (Figure 11), détachées de leur glandes séminales associées, et les spermatozoïdes contenus dans les vésicules peuvent ainsi être mis en solution.

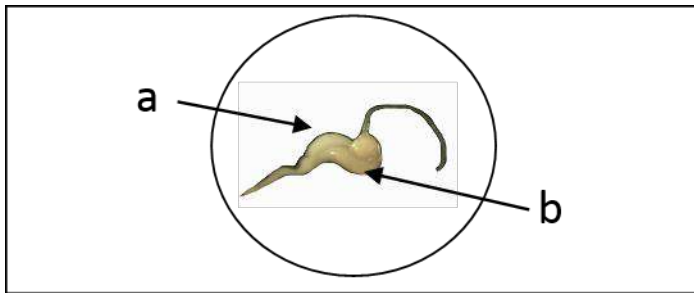


Figure 11: A : schéma d'une lame de microscope où est déposée la glande séminale (b) attachée à la vésicule séminale (a). B : vésicule séminale détachée de la glande séminale. On remarque la « pelote » de spermatozoïdes, beige argentée, dans la partie ronde de la vésicule. (Photos-shéma, J. Poidatz)

A.1.3 Structure des testicules et spermatogénèse.

Les testicules des hyménoptères (Figure 12.A) sont structurés en groupes de follicules séminaux (Figures 12.B, C, D), où sont produits les spermatozoïdes (la **spermatogénèse**) (Fiorillo *et al.* 2008). Le processus de différenciation des cellules souches, les spermatides (Figure 12.E), en spermatozoïdes, est appelé **spermiogénèse**.

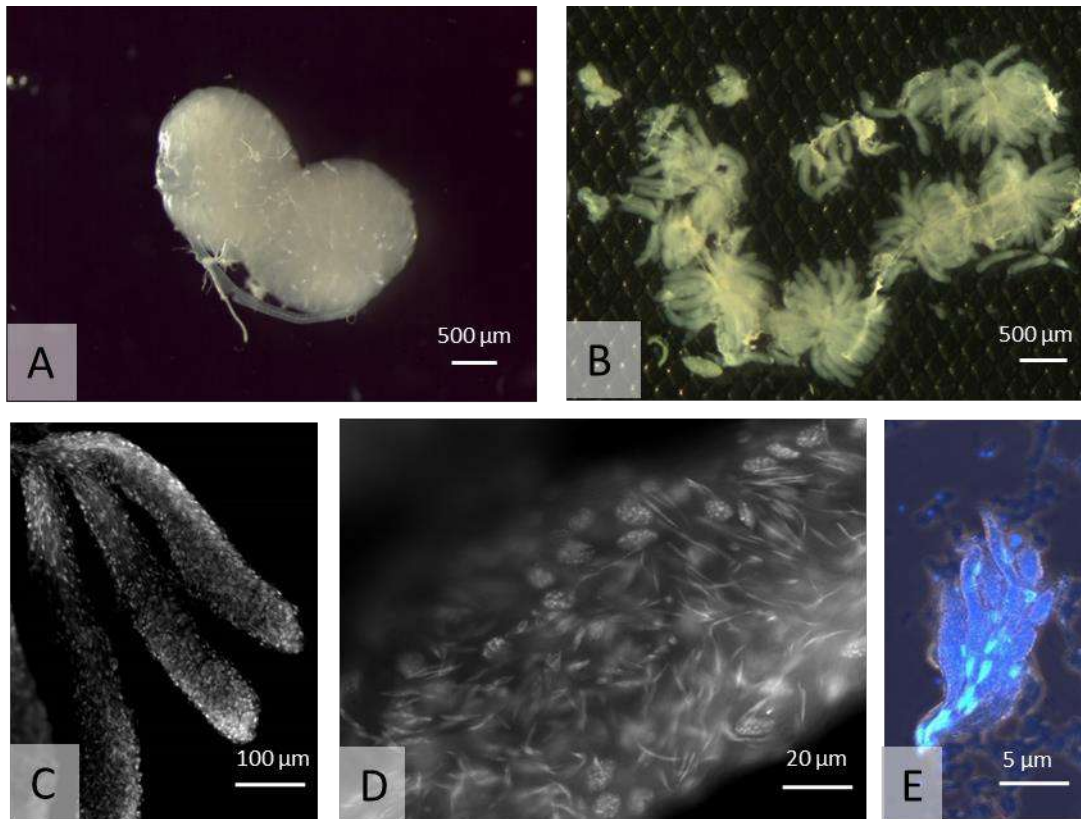


Figure 12 : Focus sur la spermatogénèse chez *V. velutina*. A. Testicules de frelons (X5). B. Un testicule de frelon étalé, mettant en évidence une organisation typique en ‘régimes de bananes’ des follicules séminaux. C. Follicules séminaux d’un jeune mâle (coloration DAPI, X45). D. Vue de spermatides en cours de différenciation à l’intérieur d’un follicule séminal (Coloration DAPI, X100). E. Exemple de spermatides en cours de différenciation où les noyaux et flagelles s’allongent. (Photos A,B par J. Poidatz et C, D, E par C. Bressac)

La spermiogénèse observée chez *V. velutina* est classique. Elle passe, tout d’abord, par la division des cellules initiales, rondes, les spermatocytes 1 (Bowen 1920). Une fois que les cellules se sont suffisamment multipliées (256 noyaux), les noyaux se condensent, s’allongent, et les flagelles commencent à grandir. Les spermatides ainsi formés vont pouvoir se séparer d’abord en gardant un point d’attache à l’extrémité du noyau, puis seront libérés totalement, finiront leur maturation avant de pouvoir enfin être transférés dans la vésicule séminale (Figure 13).

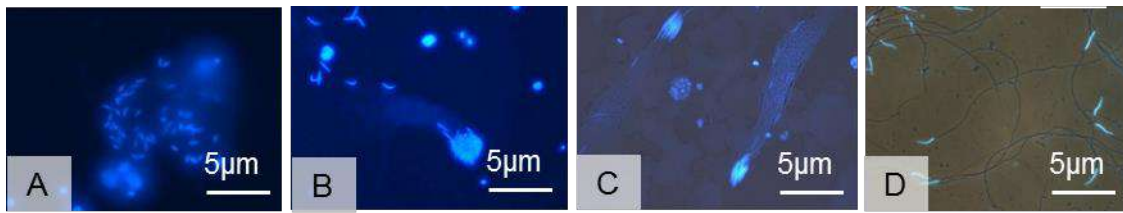


Figure 13 : Spermiogenèse chez *V. velutina* : A : spermatides d'une pupe non mélanisée (les noyaux sont rond) ; B : spermatides d'un mâle émergent (les noyaux des spermatides sont courts et soudés, les flagelles s'allongent) ; C : spermatides d'un mâle de 5 jours (les noyaux des spermatides sont encore groupés mais bien allongés, les flagelles sont également bien allongés) ; D : spermatozoïdes d'un mâle de 10 jours (issus des vésicules séminales) (Photos J. Poidatz).

Chez la plupart des hyménoptères, la spermatogenèse se déroule avant ou peut après l'émergence de l'imago (**spermatogenèse synchrone**), entraînant par la suite une dégénérescence des testicules : c'est le cas chez *V. velutina* (voir [Article 1](#) et la différence entre la [Figure 14.A](#) et [14.B](#) après 10 jours). Chez d'autres hyménoptères ce phénomène est continu (**spermatogenèse continue**), *i.e.* au lieu d'une vague unique de production de spermatozoïdes, ils sont produits par les testicules tout au long de la vie du mâle ([Damien et al. 2003](#), [Bressac et al. 2008](#), [Nguyen et al. 2013](#)). Dans le cas d'une spermatogenèse synchrone, on observe au niveau des testicules une disparition des spermatides en division dans les follicules après leur vague de production ([Figure 14](#)). Après cela, la taille des testicules diminue suite à leur dégénérescence.

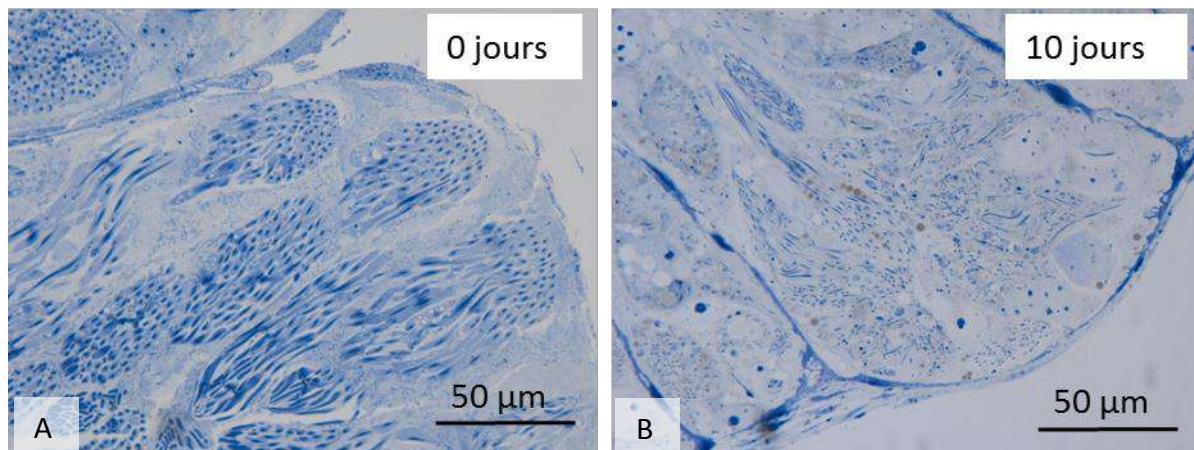


Figure 14 : Coupes d'un testicule de mâle de *Vespa velutina* : A : testicule d'un jeune mâle juste après émergence, de nombreux spermatides remplissent les follicules distendus, B : testicule d'un mâle de 10 jours, les follicules sont alors vidés et rétrécis suite à la dégénérescence testiculaire. (Photos C. Bressac)

A.1.4 Production de mâles précoces chez *V. velutina*.

La production de mâles précoces chez *V. velutina* avait été décrite pour la première fois par [Arca \(2012\)](#) lors de sa thèse, qui posa l'hypothèse de la présence de mâles diploïdes dans la population. Depuis, des mâles précoces ont également été observés par [Monceau et al. 2013a](#), puis [Darrouzet et al. 2015](#) ont observé des mâles dans certaines colonies dès le mois d'Avril, et ont montré que la majorité des mâles produits tout au long de l'année étaient **diploïdes**. Rappelons que les hyménoptères sont des insectes haplodiploïdes, et donc que les femelles sont issues d'œufs fécondés, et les mâles d'œufs non fécondés. Pour exprimer le sexe femelle, deux versions d'un même gène sexuel doivent être lues. Dans le cas des mâles diploïdes, on a affaire à un œuf fécondé, où une mutation sur le locus de ce gène empêche sa double lecture. Ainsi l'œuf fécondé donnera naissance à un individu exprimant le sexe mâle au lieu du sexe femelle, mais avec une double information génétique. Les mâles diploïdes apparaissent dans des populations consanguines où cette mutation est conservée.

Le coût de la diploïdie varie chez les hyménoptères, et la fréquence de mâles diploïdes est souvent considérée comme un indicateur de déclin des populations ([Zayed et al. 2004](#)). En effet, la production

Axe 1

de mâles diploïdes augmente le taux de mortalité des colonies en diminuant leur vitesse de développement, ces mâles précoces ne pouvant pas œuvrer pour la colonie comme les ouvrières (collecte de ressource, défense, exploration, soin au couvain) (Plowright & Palet 1979, Ross & Fletcher, 1986). De plus, les mâles diploïdes sont décrits comme quasiment stériles et incapables de se reproduire chez beaucoup d'espèces, ou encore ils peuvent être moins choisis par les gynes pour s'accoupler (El Agoze *et al.* 1994). Leur descendance potentielle, triploïde, est stérile et avec une viabilité réduite (Thiel & Weeda 2014).

Bien souvent des **mécanismes** permettent **d'éviter** la consanguinité qui augmenterait les risques d'accouplements entre porteurs de la mutation, résultant en la production de mâles diploïdes. Chez les polistes invasifs *Polistes dominulus* par exemple, les mâles diploïdes sont moins choisis par les reines pour les accouplements (Liebert *et al.* 2010). Chez *V. velutina*, Monceau *et al.* 2013a décrivent que sur des nids en captivité les jeunes mâles sont chassés hors de leur colonie par les ouvrières, ce qui pourrait aider à limiter les accouplements intra-nidaux.

D'autres mécanismes pouvant **compenser** la diploïdie peuvent se mettre en place chez certaines espèces : par exemple en 2004, Cowan & Stahlhut, n'ont observé aucune différence entre la viabilité ou la fertilité des descendants produit des mâles diploïdes chez la guêpe *Euodynerus foraminatus*: cela mettrait en cause des phénomènes de **compensation physiologiques** qui rendraient les spermatozoïdes haploïdes chez les mâles diploïdes. Pour les espèces capables de compenser la diploïdie, la production de mâles tout au long de l'année qu'elle permet est une force qui contribue à maintenir un taux de reproduction élevé avec des individus proches génétiquement. Chez certains hyménoptères se reproduire dans son nid natal avant de se disperser est chose commune (Pamilo 1985). La fréquence de femelles triploïdes dans les populations d'hyménoptères sociaux comme les guêpes et les fourmis semblerait même être grandement sous-estimée (Krieger *et al.* 1999). Des études supplémentaires comportementales seraient de ce fait très intéressantes à faire chez *V. velutina* pour estimer le « coût » réel de cette diploïdie chez cette espèce.

Axe 1

L' article présenté ci-après a pour objectif à la fois de décrire la dynamique de maturation sexuelle des mâles de *V. velutina*, mais également de comparer la fertilité de mâles suivant leur période d'émergence, précoces ou automnaux.

ARTICLE 1: Delayed sexual maturity of males in *Vespa velutina*.**Juliette Poidatz**, Christophe Bressac, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.Published in *Insect Science* (February 2017)**Abstract**

Vespa velutina var *nigrithorax* (Lepelletier, 1835) is an invasive predator of bees accidentally introduced in France in 2004, and it is having a serious impact on apiculture and ecosystems. Studying the reproduction of an invasive species is key to assess its population dynamic. This study explores the sexual maturation of *V. velutina* males and the evolution of their fertility. The main studied parameters were physiologic (spermiogenesis, spermatogenesis) and anatomic (testes size and structure, head width). Two populations of males were described based on their emergence period: early males in early summer or classic males in autumn. Each testis has an average of 108 testicular follicles. Spermatogenesis is synchronous, with only 1 sperm production wave, and completed, on average, at 10.3 d after emergence with the degeneration of the testes. The sperm counts in seminal vesicles of mature males are 3×10^6 in October/November and 0.8×10^6 in June. In comparison, females store 0.1×10^6 sperm in their spermathecae. The early males emerged from colonies made by fertilized queens. The reproductive potential of these early males seemed limited, and their function in the colony is discussed. The sperm stock evolution in autumn males suggests the occurrence of a reproductive pattern of male competition for the access to females and a single copulation per male. The synchronicity of male and foundress emergences and sexual maturation is of primary importance for the mating success and the future colony development.

Introduction

Mating success is key to understand and predict population dynamic patterns in animals. Due to their rapid expansion, invasive species are particularly susceptible to the mating potential of both females and males. In most studies, the reproductive potential is considered as how females can mate and produce the next generation. Even if, usually, males are considered a nonlimited and disposable

Axe 1

resource in terms of mating potential (Page, 1986; Fjerdingstad & Boomsma, 1998; Crozier & Fjerdingstad, 2001), numerous studies on different insect orders still assess the importance of sperm production in their population dynamic (Diptera, Letsinger et Gromko, 1985; Yamagishi *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 2003; Hymenoptera, Allen *et al.*, 1994; Stein & Fell, 1994; Stein *et al.*, 1996; Chevrier & Bressac, 2002; Baer & Boomsma, 2004; Araújo *et al.*, 2010; Beani *et al.*, 2014; Baer 2014).

Male sperm donation is an essential factor for the reproductive success in all sexual animals, especially in social insects (Boomsma *et al.*, 2005; Baer, 2014). In Hymenoptera, diploid females result from the fertilization of 1 oocyte by a spermatozoon, while haploid males are the result of non-fecundated oocytes (Hartl, 1971; Cook & Crozier, 1995). Certain situations of poor male fertility result in constrained females that produce male-biased sex ratios (Lacoume *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2013; Chirault *et al.*, 2015). Such outcome was evidenced in nonsocial Hymenoptera; however, it could be of major importance in social species as well because the colony success depends on the workers, that is, diploid females (Plowright & Palet, 1979). Then, the sex-ratio of the queen's offspring will depend to some extent on the sperm stock in the spermatheca. Males are classically produced by unfertilized eggs laid either by queens or workers with functional ovaries (see Spradbery, 1973 for hornets). In hornets, it only occurs when the foundress is missing (Takahashi *et al.*, 2004; Spiework *et al.* 2006).

Spermatogenesis is a useful indicator of male sexual maturation. Sperm production has been described in several social hymenoptera such as Formicidae (Wheeler & Krutzsch, 1992), Apidae (Cruz-Landim, 2001; Araújo *et al.*, 2005; Mônica *et al.*, 2005), and some Vespidae (Bushrow *et al.*, 2006). In such cases, the spermatogenesis is generally synchronic, that is, a single wave of sperm production occurs, and the testis produces a determined quantity of sperm that is transferred to the seminal vesicles until copulation (Roosen-Runge, 1977); then, the testis degenerates in the adult male. In some parasitoid wasps, the spermatogenesis is continuous (Damiens *et al.*, 2003; Bressac *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2013); that is, it occurs along the entire or almost the entire life of males. The reproductive system varies in male Hymenoptera and shows differences in its structure, in the time of testis degeneration, in its size, in its morphology, and in both number and quality of the spermatozoa

(Dirks & Sternburg, 1972; Watson & Martin, 1974; Simmons & Siva-Jothy, 1998; Morrow & Gage, 2000; Damiens *et al.*, 2002; Damiens & Boivin, 2005).

The yellow legged hornet, *Vespa velutina* var *nigrithorax* (Lepelletier, 1835), is an invasive predator of arthropods and especially of honeybees, which was accidentally introduced in France around 2004 (for a review, see Monceau *et al.*, 2014a; Arca *et al.*, 2015). This specie is now present in half of the French territory (Monceau *et al.*, 2014a for a review), in Italy (Porporato *et al.*, 2014), Portugal (Grosso-Silva & Maia, 2012; Bessa *et al.*, 2016), Spain (López *et al.*, 2011), and more recently England and Belgium (2016). In Asia, *V. velutina* has also recently colonized Korea (Kim *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2012) and Japan (Ueno, 2015).

After 6 months of worker production, hornet queens of temperate climatic regions produce a large amount of future gynes and males (Du Buysson, 1903, 1904 [1905]; Spradbery, 1973; Edwards, 1980; Matsuura & Yamane, 1990). Newly emerged males stay in the nest around 8 d in *V. simillima* (Martin, 1991) and 8–11 d in *V. affinis* (Martin, 1993), profit from food, and increase their weight until their nuptial flights (West-Eberhard, 1969; Kasuya, 1983). This phenomenon has already been observed in *V. velutina* nests in captivity (e.g., Monceau *et al.*, 2013a).

The occurrence of female multiple mating is low in hornets (Foster *et al.*, 1999, Foster & Ratnieks, 2000; Strassman, 2001), hence, *V. velutina* foundress has been shown to mate more than once (2.4 mating on average; 8 max; Arca *et al.*, 2012). If the spermatozoa production allows to fill up the spermatheca, then the observed multiple mating would promote the hypothesis that foundresses mate with several partners to either increase the colony size and genetic diversity (Loope *et al.*, 2014), or limit the risks of colony infection by diversification of the daughters immune system (Baer & Schmid-Hempel, 1999, 2001; Cremer *et al.*, 2007). Jaffé *et al.* (2012) showed that in such cases of multi-mating, paternities are strongly biased toward 1 or very few males. Studying the reproduction of an invasive species is a key to assess its population dynamic, and acquire information on both male mating potential and the sperm need of queens is important to enlarge our knowledge on the

Axe 1

reproductive biology of this invasive predator but also to plan new strategies to contrast/monitor its expansion.

The aim of present experimental study was to analyze the sexual maturation of *V. velutina* wild males in different periods of their life cycle. Several questions are raised in the present paper: (i) Does the production of sperm increase in time? (ii) Is sperm produced during their entire life? (iii) When are the males most fertile? (iv) What are the sexual anatomic changes during a male's life and how long does the spermatogenesis last? (v) Are there differences in those parameters between October/November and June males? To answer these questions, we dissected 98 wild *V. velutina* males of different ages, at 2 different periods and from 7 different field collected nests. We also investigated their testis morphology and their sperm availability.

Materials and methods

Maintenance and origin of the hornets

In autumn, 4 colonies of *V. velutina* were collected in the Bordeaux area (France) (n = 72 individuals); nests 1, 2, and 4 were collected in Bordeaux on 14/10/2014 (44°49'12.712–0°34'39.128), on 23/10/2014 (44°51'18.094–0°34'48.615), and on 10/11/2014 (44°49'26.977–0°33'4.568), respectively; nest 3 was collected on 6/11/2014 in Latresnes (44°47'5.287–0°30'22.226). The nests were “mature,” as the largest combs were approximately 40–60 cm wide. During late spring, we collected 3 nests from different places in Bordeaux - le Haillan on 25/06/2015 (44°52'23.401–0°40'40.49) and observed the emergence of 26 males during this period. The nests were young, with a comb diameter between 50 and 110 mm.

The nests combs of the collected nest in the 2 seasons were maintained in aerated plastic boxes in the dark in a climatic chamber at 23 ± 1 °C. Two sizes of boxes were used according to the comb size: 130 mm × 130 mm × 205 mm boxes and 265 mm × 215 mm × 360 mm boxes. We examined the adult emergences twice a day; resulting in an uncertainty less than 12 h in the emergence date. The newly emerged hornets of both seasons were kept in similar conditions in a climatic chamber at 23 ± 1 °C, 12 h light : 12 h dark, to homogenize their development speed. For each individual, both nest

Axe 1

origin and emergence date were recorded. The different emerged adults were grouped in meshed lid boxes by sex and nest, with water, honey and a shelter. Males were raised in such conditions until they were dissected. The raising boxes had an adapted size of the sampled group (5 hornets in 110 mm × 110 mm × 160 mm boxes, and 10 hornets in 130 mm × 130 mm × 205 mm boxes). In total, 98 virgin males of different ages, from nonmelanized pupae (the youngest stage observed here—2 individuals) to 62-d-old adults, were dissected.

Males dissection

The head width of the hornets was measured using a digital caliper (Linear Tools 2001, 0–150 mm) that was placed on the larger length of the face, from one eye to another. The dissection was performed in a Petri dish (70 mm diameter) with Ringer's solution (Hayes, 1953). After killing the hornet by deep freezing, the abdomen was separated from the thorax by cutting the waist, and it was dissected by opening between the 2nd tergite and the abdomen apex using precision forceps (Dumont, Montignez, Switzerland 5Ti and 5I). The entire reproductive tract could thus be extracted (Fig. 1). Close to the last tergite, the aedigium is connected to the seminal glands (Fig. 1C) and the seminal vesicles (Fig. 1B), which are connected to the testis (Fig. 1A), near to the first tergite, via the deferent canal.

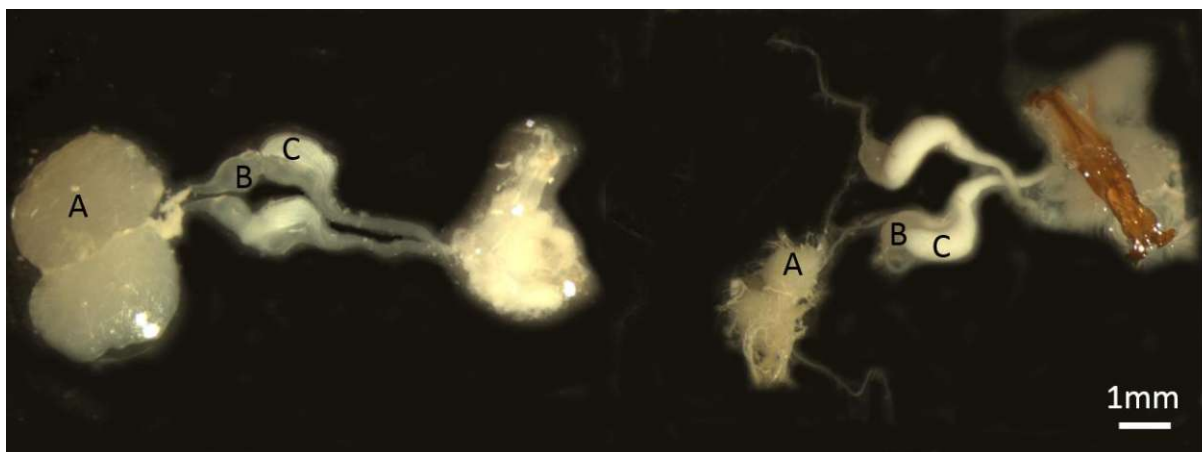


Figure 1. Tractus of a black pupae (left) and a 13-d-old *Vespa velutina* male (right). (A) Testes, (B) seminal vesicles, (C) seminal glands (binocular picture, $\times 0.63$).

Testes size

Once the testes and the pair of seminal glands and vesicles were separated from the rest of the organs with ultra-precise forceps (Dumont 55 I), for each individual a picture was stored (Binocular magnification 63). Then, the testes area and length were measured using ImageJ.1® software analysis. These measures of testes surfaces (TS) were used to describe the dynamic of their size, while the testes diameters (length) were used to compare males between the seasons, with a correction of the testes length by the head width.

Testes structure

The testes of 15 October/November males were flattened to assess their structure. In hymenopterans, the testes are made of testicular tubules also named follicles. Follicles are assembled by groups as petals of a flower (Fig. 2). First, the average testicular tubules numbers in each group was counted, then the total number of testicular tubules in each testis and individual.

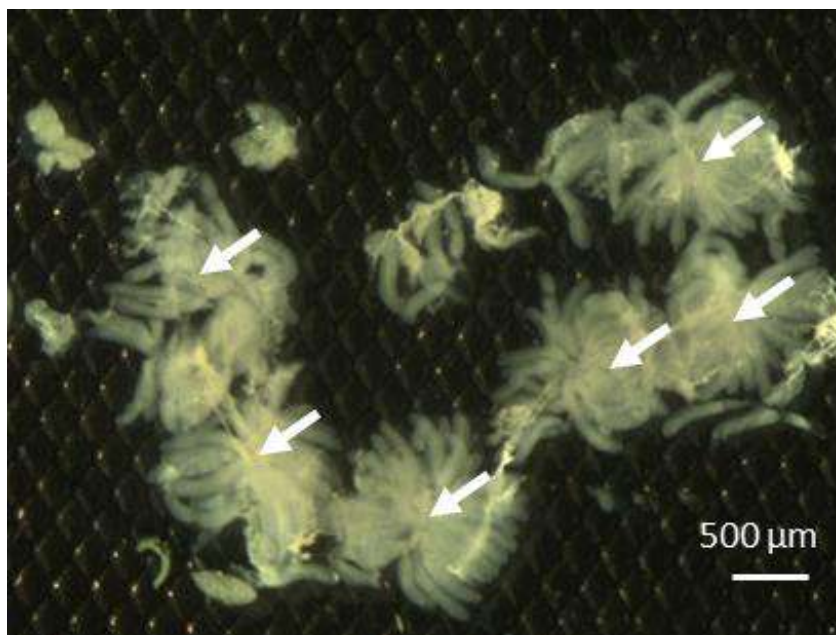


Figure 2. Photograph of a *Vespa velutina* male testis spread on a microscope slide. The white arrows indicate the centers of testicular follicles groups.

Spermatogenesis

As in all insects, spermatogenesis occurs in cysts where the future sperm cells are grouped throughout their multiplication and differentiation (Dallai, 2014). To characterize each follicle maturity, the differentiation stages of the cysts were assessed using DAPI coloration in 25 males at different ages from 0 to 15 d.

Histological section

Freshly dissected male tracts were fixed by incubation for 48 h in a mixture of 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 mol/L cacodylate buffer (pH 7.4) with 0.1 mol/L sucrose. They were washed in 0.1 mol/L cacodylate buffer (10 min) and water (3×10 min), dehydrated in a graded series of ethanol solutions (50% 2×10 min, 70% 3×15 min, 90% 3×20 min, 100% 3×20 min) and propylene oxide (100%, 3×20 min), and embedded in Epon resin (Sigma-Aldrich, USA), which was allowed to polymerize (24 h for 37 °C, 48 h at 60 °C).

Semifine sections (500 nm thick) were cut with a “Leica Ultracut UCT” ultramicrotome, stained with toluidine blue for 30 s at 60 °C, washed with distilled water for 5 s, ethanol 100% for 10 s, and distilled water again for 20 s, dried at 60 °C and embedded in Epon resin, which was allowed to polymerize for 48 h at 60 °C.

Sperm production

The seminal glands were removed from the seminal vesicles, which contain mature sperm, using a sharp needle and directly transferred in a drop of saline, on a microscope slide. The seminal vesicle was pierced and a homogeneous solution of sperm was obtained by gently rotating the forceps in the sperm mix until its coloration shifted from white to transparent. The vesicle wall fragments were removed after pressing it to ensure to collect all of the spermatozoa. After ethanol fixation and DAPI staining method for nuclei (Bressac & Chevrier, 1998), slides were observed under an epifluorescence microscope (magnification $\times 40$). From the total 72 autumn males, we counted the sperm in both seminal vesicles in 69 of them, and in 1 seminal vesicle in the 3 others. Note that, 14 out of 26 males dissected in June were 10–20 d old. Due to this undetermined male age, the corresponding data was

only used for a comparison of sperm production with $n = 59$, 10- to 20-d-old October/November males.

Fertility of the June queens

In order to check if the presence of males in June was due to a lack of sperm in the queens' spermatheca, the 3 queens of the 3 different nests collected in June (from which the June males emerged) were dissected. After killing the queens by freezing, their spermatheca was extracted, the content of it was spread in a Ringer solution drop (description above) on a microscope slide and, as we did earlier with the males seminal vesicles, a homogeneous sperm mix that was fixed with ethanol and colored with a DAPI solution was made.

Sperm counting methodology

From the microscope slides of males and females, 10 microscope fields randomly chosen were counted (5 fields in each seminal vesicle preparation for males, e.g., 10 fields par male, and 10 fields for the female's spermatheca). The methodology of sperm preparation with the Ringer's solution drops was sufficiently homogeneous; thus, the counting variability was considered acceptable. Then, the cumulative surfaces of the fields were extrapolated to the entire surface of the preparations, which was measured using an ellipsoid formula ($a \times b \times \pi$, where a and b are the maximum dimensions of the quasi circular preparation). To estimate the total number of spermatozoa produced by 1 male (n), we added the number of spermatozoa from both seminal vesicles; for the 3 males where only 1 seminal vesicle was mounted, the count was multiplied by 2. Such method is equivalent to a dilution but without risk of sperm loss or destruction in the course of successive manipulations.

Statistics

Data is given as mean $\pm$ standard error. All of the statistical tests were performed using R3.1.2.© software. For the comparison of the testes diameter between autumn males and summer males, we eliminated a potential bias linked to the male size by dividing the testes length by the head width. To test the differences between the summer and autumn populations, we assessed the normality of the data using a Shapiro test and, then, a Student's test was used if the data was normally distributed or a

Axe 1

Kruskal–Wallis rank test otherwise. To test the correlation between the different morphological elements, we used a Spearman's correlation test if at least 1 argument had a non-normal distribution.

The modeling of the evolution of testes' area and sperm amount through time was performed with Matlab©.

The colony 3 was overrepresented in the sampled males (n = 57 individuals/72 October/November males), therefore, because of statistical rigor, no comparisons between colonies were made.

Results

Testes size and structure

The testes surface (TS) decreased with age regardless of the male emergence time, that is, autumn or summer (Fig. 3). We estimated the sample equation (exponential function) using a fitting function and the analysis of the curve variation allowed us to assess the stabilization period when the decrease was inferior to 0.05%. Likewise, a stabilization point was found at 10.3 d (9.58–11.18) with 95% confidence. After this period, the testes area was established and stabilized at $1.10 \pm 0.39 \text{ mm}^2$, which corresponds to a diameter of $1.33 \pm 0.30 \text{ mm}$. This degeneration of the testes is easily visible in the histological sections when comparing of Fig. 4(A–C) (young males) to Fig. 4(D, E) (old males).

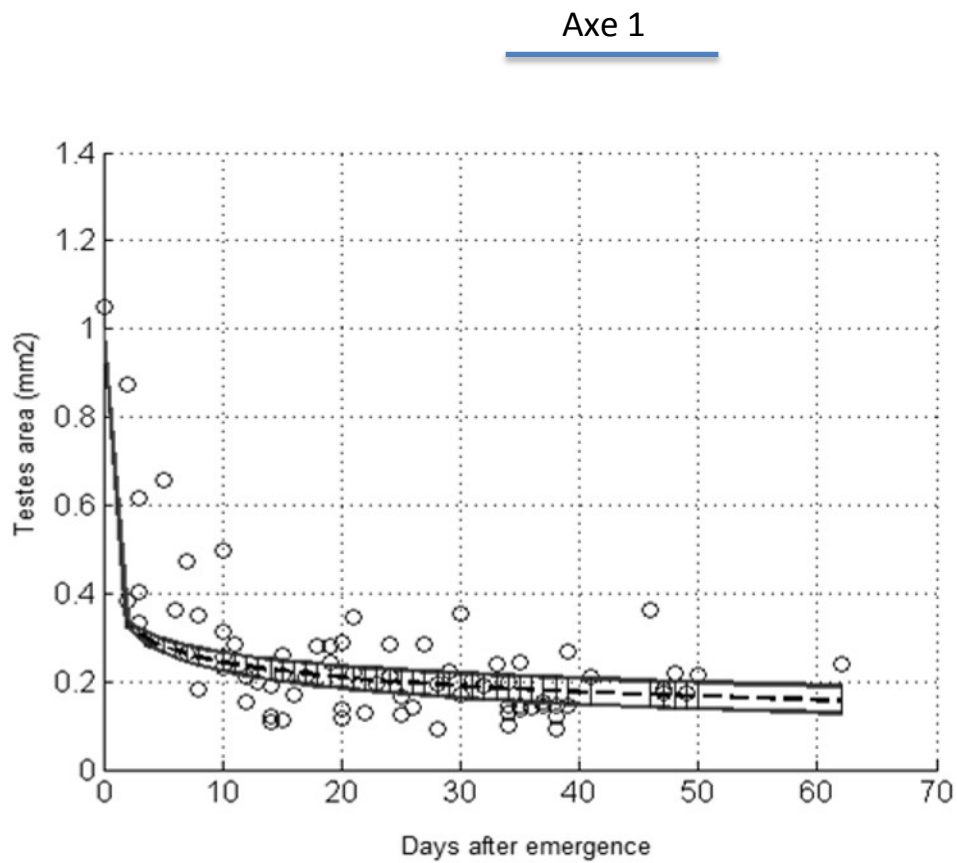


Figure 3. Evolution of the average testes surface of *Vespa velutina* males with their age.

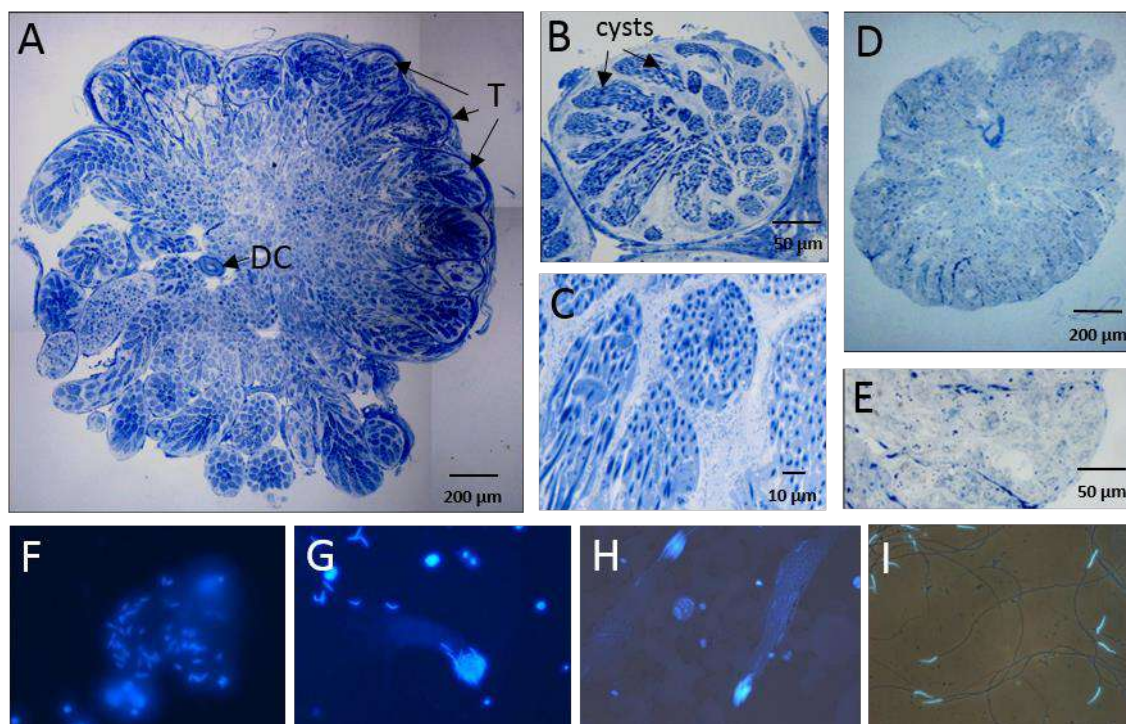


Figure 4. (A) Histological section of a 0-d-old *Vespa velutina* (Vv) male testis, formed by tubules (T) and a deferent canal (DC) in the center. (B) Zoom on a tubule section of a 0-d-old Vv male showing

developing cysts. (C) Transversal sections of cysts showing spermatid nuclei in dark blue and cytoplasm in clear blue. (D) Histological section of a 10-d-old Vv male degenerated testis. (E) Zoom on a histological section of a tubule of a 10 d old Vv male, no cysts are visible in the empty tubules. Spermatids of a Vv white pupae (F, unelongated nuclei), 0-d-old Vv (G, grouped short nuclei, elongating flagellum), 5-d-old Vv (H, grouped elongated nuclei, elongated flagellum), and 10-d-old Vv (I, free sperm from seminal vesicles).

The testes were made of 9.14 ± 1.95 groups of testicular tubules. Each group contained an average of 11.33 ± 2.55 testicular tubules. Each testis had an average of 108.34 ± 27.18 testicular tubules, and each individual possessed an average of 201.21 ± 72.07 testicular tubules.

Spermatozoa differentiation stages in the testes

The testes were more or less active as a function of the male age and produced different stages of spermatids. We observed characteristic spermiogenesis stages, which differed in both nucleus shape and number per cyst at different ages. At first in white pupae, we observed not fully elongated nuclei spermatids (Fig. 4F), second, early elongated spermatids that stay connected by both extremities (Fig. 4G). Third, fully elongated spermatids that are connected by 1 extremity (Fig. 4H). By the end of the process, the mature spermatozoa were free (Fig. 4I) and were transferred to the seminal vesicles. From the emergence to 10 d, cysts of immature spermatid stages were found, and all of the spermatozoa matured after the 10th day.

October/November versus June males

The number of spermatozoa in the seminal vesicles of October/November and June males varied as a function of their age (Fig. 5). Before 10 d, mature spermatozoa were anecdotic in the seminal vesicles. All of the individuals from the 2 samples with ages between 10 and 26 d were considered (June: n = 21; October/November: n = 26), and tested for different parameters.

Axe 1

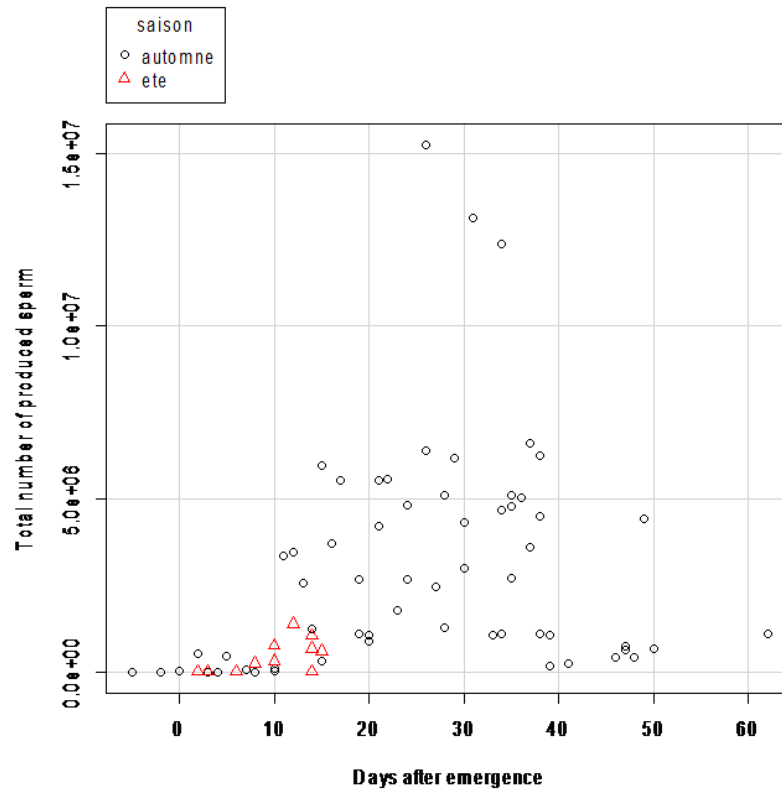


Figure 5. Evolution of the number of spermatozoa in the seminal vesicles of *Vespa velutina* males with their age (triangles: June males, circles: October/November males).

First, we examined the sperm production (Fig. 6), which was significantly lower in June males than in October/November ones (average $7.62 \times 10^5 \pm 6.49 \times 10^5$ and $5.56 \times 10^6 \pm 4.18 \times 10^6$ sperm, respectively; KW test, $k = 13.21$, $df = 1$, $P < 0.01$). The sperm amount variability was higher in October/November males. June males had smaller testes diameters than the October/November males (1.12 ± 0.36 mm and 1.27 ± 0.27 mm, respectively), even after correcting for head width (0.21 ± 0.07 and 0.24 ± 0.05 , respectively) (KW test, $k = 4.37$, $df = 1$, $P = 0.036$). The head width of the June males was significantly smaller than the October/November one (5.24 ± 0.18 and 5.45 ± 0.15 mm, respectively) (Student's t-test, $P < 0.01$, $n = 47$). The higher longevity at 23 °C for a male was 62 d; thus, a survival up to 2 months in laboratory conditions is expected.

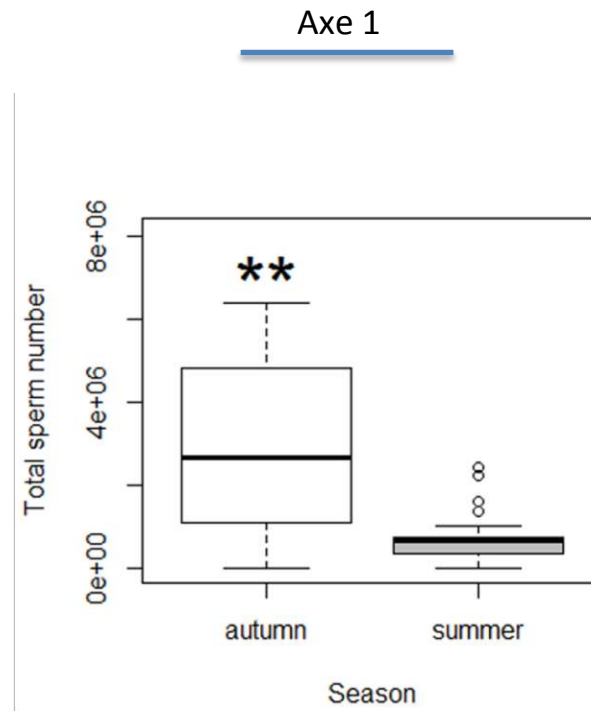


Figure 6. Sperm production, depending on the emergence period, in 10- to 25-d-old males, KW rank test.

There was no correlation between the male head width and the number of spermatozoa (Spearman's test, $\rho = -0.19$, $P = 0.24$) and its testis length (Spearman's test, $\rho = -0.09$, $P = 0.51$), nor between the testis surface and the number of sperm produced (Spearman's test, $\rho = -0.14$, $P = 0.36$).

Sperm stock in June queens

Half of the emerging individuals collected from the nests between the 28/06/2015 and the 15/07/2015 were males. The 3 queens of these June nests weighed 521.4, 454.8, and 509.6 mg, and the sperm contents in their spermatheca were 102.4×10^3 , 111.6×10^3 , and 136.1×10^3 spermatozoa, respectively.

Discussion

Male sexual maturation

The general structure of the *V. velutina* male tract is similar to that of other hymenopterans, and it is known that the testicular follicles number per testis varies significantly among species. The basal Apidae, for example, can have 3 (Mellitinae and Apidae s. stricto; Roig-Alsina *et al.*, 1993) to 28 tubules (*H. foveolatum*; Genissel *et al.*, 2009), while *Apis mellifera* can have 250 tubules (Chapman,

1998). In 3 parasitoids wasps of the Chalcidoidea family, Fiorillo *et al.* (2008) described only a single testicular tubule. Instead, the number of tubules varies from 1 to 25 in Formicidae (Wheeler & Kruttsch, 1992). With an average of 201 tubules, *V. velutina* seems to invest strongly in sperm production, at the same level as male honeybees, which is an extreme among hymenopterans.

In *V. velutina* males, the spermatogenesis begins at the pupal stage and ends in the adult stage, at approximately 10 d. Compared with other hymenopterans, this maturation period is considerably long; in general, the male maturation is close to emergence (Araujo *et al.*, 2005; Boomsma *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2008). At 25 °C, we observed a pupal development period of average 15 d (our unpublished data, n = 3, by marking a new sealed brood cell and checking daily its opening). These results were obtained in controlled conditions, and maturation dates may differ to some extent in natural conditions. Still these results seem coherent with previous observations made on other *Vespa* species: the sexual maturation period could be related to the period when males stay in their nest for feeding (around 8 d for *V. simillima*; Martin, 1991 and 8–11 d in *V. affinis*; Martin, 1993), and the sealed brood developmental period of *V. simillima* was assessed at 15 ± 0.6 d by Martin's (1991) model on Matsuura's (1984) data. As expected for *Vespidae*, the spermatogenesis of this species is a synchronic phenomenon. All cysts of developing spermatid were at the same stage in the testis. We found only 1 wave of synchronous sperm release, and then the testes size significantly decreased. Only matured sperm stored in the seminal vesicle can be transferred during mating to the female. Even if our experiments took place in laboratory with regulated conditions, it is probable that during the first 10 d of the adult stage, males are not able to mate, at least with sperm transfer. We showed a declining dynamic in the sperm availability in the seminal vesicles after 40 d. However, the majority of the males were from nests 1 and 2 after this date; thus, we cannot assert whether this phenomenon is either related to the age of the hornets, the nest identity, or a physiological issue. Likewise, the survival of males of more than 40 d might be a laboratory artifact. In the wild, males are probably unable to live as long.

In the autumn, an important variation in the spermatozoa production was observed among males emerged from the same nest. All of the imago males were kept under the same controlled climatic

Axe 1

conditions after emerging; therefore, the sperm production could be linked to the quantity and type of food received by the males when they were larvae. In summer, the variations of sperm production among the nests were not significant, probably because the nests were smaller and the food was more equally distributed. Such food dependence on both male abundance and their sperm supply was already observed in *Bombus terrestris* under lab conditions (Genissel *et al.*, 2002).

The sperm production after 10 d was in the range of 1.5×10^5 to 1.5×10^7 per male, with an average at 3×10^6 , which is in large excess compared to what was found in the queen's spermathecae in early summer (26 times more, average $116.7 \times 10^3 \pm 17.41 \times 10^3$). For comparison, a normally sized drone has an average 11.6×10^6 sperm in its seminal vesicle (Schlüns *et al.*, 2003). Giving the offspring size of *V. velutina* foundresses, 1000 to 10 000 individuals, we can estimate that the sperm found in the spermatheca is ca. 10 times fold larger than the offspring production, and a male has 26 times more than needed for the whole paternity of workers and females of the complete progeny. If all of the natural populations are similar to the dissected foundresses, instances of sperm-limited females would be rare in nature. Schlüns *et al.* (2003) observed a connection between drone's size and fertility, as did Beani and Zaccarini (2015) and Beani *et al.* (2014) on *Polistes*, but for *V. velutina* males, the sperm quantity in the seminal vesicles could not be related to the body size of the hornet males in the same season. Still we observed that the June males were statistically smaller and less fertile than the October/November ones.

Considering the sperm allocation in males, only multiple mating experiments could provide insight into the ability of males to invest their sperm in successive females. However, neither the male tract observation—devoid of partitioned seminal vesicles or ejaculatory bulb—nor the sex ratio observed in nature (1/3 foundress vs. 2/3 males in autumn; Rome *et al.*, 2015) are in favor of the ejaculate parsimony or strategic ejaculation of males (Wedell *et al.*, 2002). Moreover, the present results show that *V. velutina* males are unable to rebuild their sperm stock after exhaustion. In the future, it could be interesting to study the role of seminal fluid in ejaculate competition in *V. velutina*, as did den Boer *et al.* (2010), to have more clues about a putative sperm stock constrain.

In *V. crabro*, males actively seek females using specific odors (Spiework *et al.*, 2006). Likewise, macroglomeruli, which are implicated in sexual pheromone detection, have been described in *V. velutina* males (Couto *et al.*, 2016). The fertility pattern is in accordance with such physiological traits and implies a reproduction strategy of male competition for the access to females and male investment in only 1 copulation.

June males

June males are smaller than October/November males, what is logical and well known in vespids because the nests cell's size are smaller in this season, but moreover, our results show that those males have a poor reproductive capacity. This production bears a cost for the colony, especially when food is limited, and food sharing would be more advantageous for worker larvae. An early male production was already observed in *V. velutina* in summer nests (Arca, 2012, Monceau *et al.*, 2013a), and also demonstrated by male captures in July (Monceau *et al.*, 2013a). The queens of the June nests, from which these June males came from, had a full sperm stock when dissected, and early diploid males were described in this species (Arca, 2012, Darrouzet *et al.*, 2015): we can then hypothesize that a big part of June males analyzed in our work was diploid, and that it could affect their fertility the same way it did on *Bombus terrestris* (Duchateau & Mariën, 1995).

In 2004, Cowan and Stahlhut studied the vespid wasp *Euodynerus foraminatus*, which produces fertile haploid and diploid males and did not find differences in their offspring viability or fertility. Thus, it could be relevant to conduct tests to assess if *V. velutina* queens are able to discriminate males based on their genetic makeup (haploid / diploid) or their sperm content.

Conclusions

Males of *Vespa velutina* present a delayed sexual maturation. Under lab conditions, they can transfer sperm only 10 d after emergence. They produce sperm in excess compared to the need of a single mating. *V. velutina* males have a high amount of testicular follicles, close to the number found in *Apis mellifera*. We found a large variability in sperm quantity among males even from the same nest, which could be attributed to differences others than genetic diversity.

The reproductive strategy of hornets is based on the synchronicity between sexually mature males and foundress emergence. Such parameters are of great importance for the success of mating and the future colony development. If males are able to copulate only once with a maximum sperm stock, and they are in excess compared to females (male-biased sex ratio), then the occurrence of virgins or females with little sperm stock would be reduced. Such reproductive process could be linked with the invasive success of *V. velutina*. Studies on male sperm potential should be included when considering the entire reproductive strategy of this invasive species to control its expansion.

Acknowledgments

We thank the chief agent of the town hall of Bordeaux, the beekeepers of Bouliac, Latresnes and Floirac (33), and the French association “Association Anti Frelon Asiatique” for helping us find and collect the nests. We also thank Dr. R. Djidjou Demasse (INRA laboratory) for his advice on modeling. Histological preparations were made by Rustem Uzbekov and Anastasiia S. Garanina of the IBiSA Electron Microscopy service of François Rabelais University and the University hospital of Tours. We thank our native English speaking colleague Mrs Avril Foucard-Welwood for English revising. We thank Bayer Crop Science, represented by Dr. Bénédicte Laborie, for the first author financial support. The authors declare no conflict of interest. The first author funding sponsor had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

A.2 Physiologie des fondatrices de *V. velutina*.

Chez les insectes sociaux, la fertilité des fondatrices est l'un des paramètres les plus importants dans le succès reproducteur des colonies (*i.e.* la quantité de nouvelles reines et mâles produits en fin d'année). La quantité d'œufs que la reine va pondre et la quantité de spermatozoïdes en stock nécessaire pour féconder ces œufs auront des effets directs sur la taille de la colonie, sa vitesse de croissance, étant dépendante du nombre d'ouvrières (haplodiploidie, voir **A.1**), mais aussi de leurs performances.

Dans cette partie nous nous attacherons à décrire et à comparer des caractères liés à la dispersion, la survie et la fertilité des fondatrices de frelons entre différentes espèces (*V. crabro*, *V. velutina*), mais également entre des *V. velutina* provenant de sites envahis depuis plus ou moins longtemps.

A.2.1 Organisation du tractus reproducteur femelle.

A.2.1.1 Ovaires et production d'œufs.

L'organisation du tractus des femelles reproductrices chez *V. velutina* est classique comparée à celle d'autres hyménoptères (voir [Figure 15](#)), avec deux ovaires constitué d'ovarioles dans lesquels les œufs sont produits. Ces ovaires sont reliés par un oviducte par lequel les œufs matures passeront, pour être au passage fécondés ou non par des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque attenante, sous régulation de la reine (démonstré chez *A. mellifera* par [Ratnieks & Keller 1998](#)).

Axe 1

Figure 15 : exemple d'organisation de l'appareil reproducteur chez l'abeille : schéma basé sur Snodgrass 1956. L'organisation de celui de la reine de frelon est assez proche, bien que les ovaires n'atteignent pas cette taille en proportion (4-5 étages de production max).

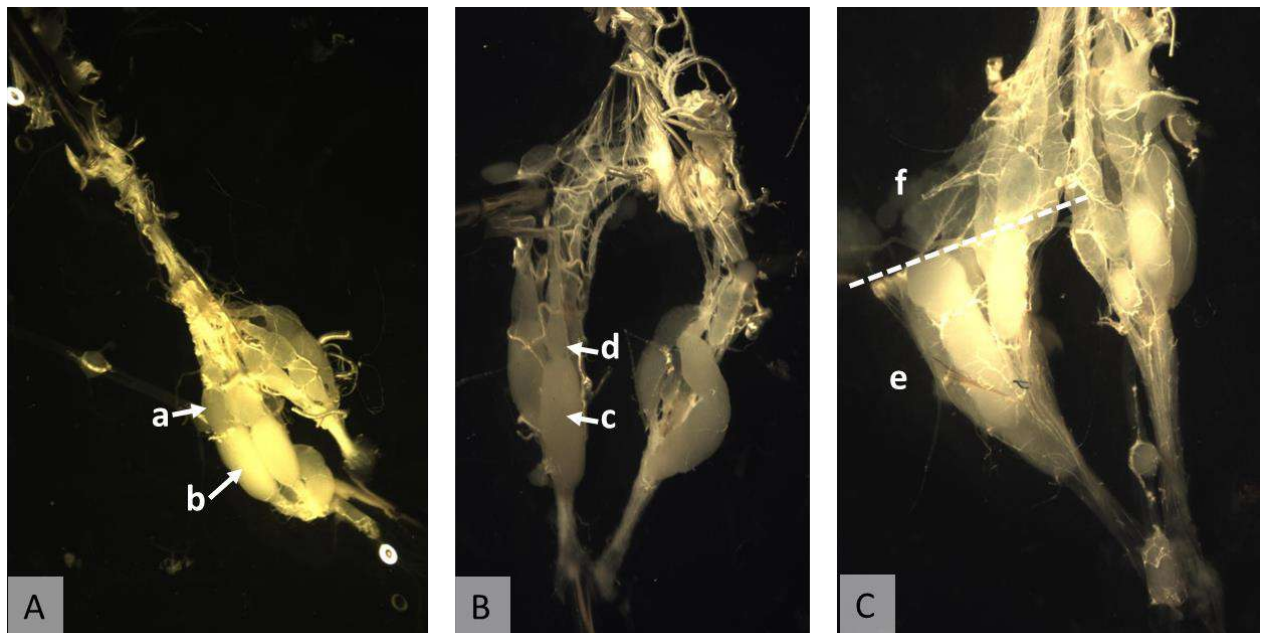
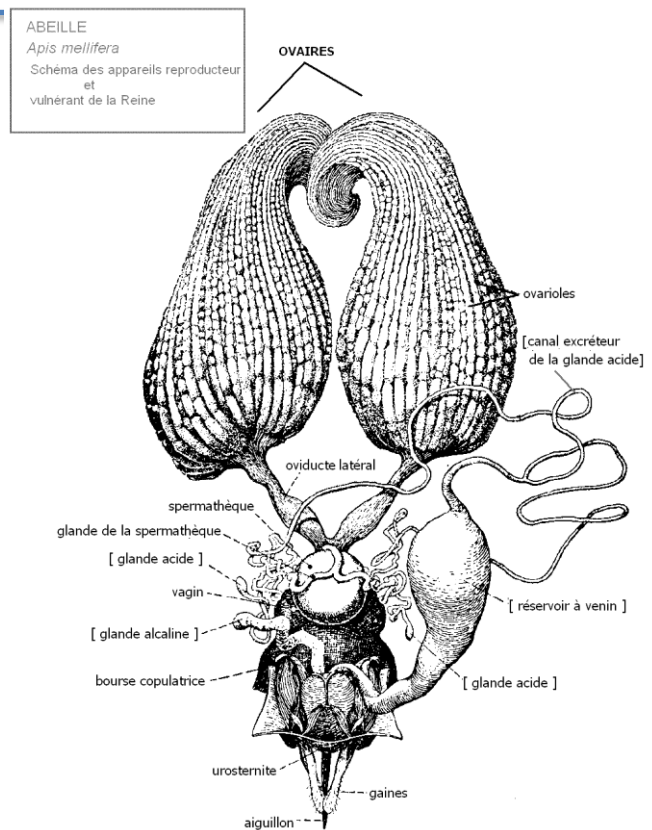


Figure 16 : Ovaires de *V. velutina* à différents stades de développement (X5). A : ovaires en début de maturation : les cellules nourrices (ou accompagnatrices) (a) sont presque de la même taille que les œufs en préparation (b). B: ovaire presque matures : les œufs (c) sont déjà 2 fois plus grands que leurs cellules accompagnatrices (d). C : ovaires matures : la production d'œufs commence à se faire sur plusieurs étages (e,f), les œufs atteignent leur taille de ponte et s'opacifient. (Photos J. Poidatz)

Axe 1

Chez *V. velutina*, les ovaires sont constitués de 8 ovarioles, dans lesquelles les œufs seront produits (Figure 16). Les œufs en cours de préparation sont couplés à leur cellule accompagnatrice – nourrice (Figure 16 A, D). Les ovaires des fondatrices commencent leur maturation seulement en sortie d'hibernation, au printemps. La production d'œufs peut se faire sur plusieurs étages une fois la colonie dans sa phase d'expansion.

Les reines constituent des réserves pour leur hibernation sous la forme de **corps gras**. Ces réserves sont pour la grande majorité constituées au nid avant le départ des reines pour leur vol nuptial et leur hibernation (Martin 1993). Les corps gras remplissent littéralement l'abdomen des reines avant leur départ : ils entourent les organes, en particulier les ovaires, mais sont également présents sur les tergites et sternites¹. Chez *V. mandarinia*, le poids des reines est réduit de 40% suite à la consommation de ces réserves durant l'hibernation (Matsuura 1966). Ce qui reste de ces corps gras sert également de réserve d'énergie pour produire des œufs. La quantité de corps gras avant et après hibernation est indéterminé chez *V. velutina* actuellement, mais nous explorerons leur présence en début de printemps dans le Manuscrit 2.

A.2.1.2 La spermathèque

La spermathèque est l'organe dans lequel la reine stocke les spermatozoïdes après s'être accouplée, afin de les utiliser pour la fertilisation de ses œufs tout au long de sa vie. Les spermatozoïdes sont compressés dans une capsule rigide pour une meilleure conservation. La spermathèque est enveloppée par une enveloppe externe appelée réservoir, reliée à des glandes accessoire de taille et de forme extrêmement variable suivant les espèces (Figure 17). Les femelles de *Vespa velutina*, qu'elles soient ouvrières ou reines possèdent toutes une spermathèque, tout comme chez *Apis mellifera* : aucune différence n'a d'ailleurs put être démontrée entre la taille des spermathèques entre ces deux castes chez cette dernière espèce (Gotoh *et al.* 2008).

¹ Tergites et sternites = plaques cuticulaires dorsales et ventrales respectivement de chaque segments de l'abdomen d'un insecte

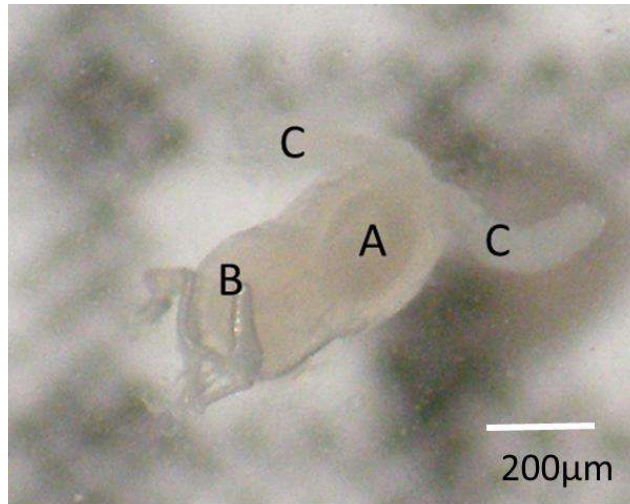


Figure 17 : Spermathèque de *V. velutina* (A), avec son réservoir (B) et ses glandes accessoires effilées (C).

Manuscrit 2: Comparison of reproductive traits of foundresses in a native and an invasive hornet in Europe.

Juliette Poidatz, Christophe Bressac, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.

Soumis à Journal of Insect Physiology (Septembre 2017)

Abstract

The population dynamics of annual social hymenoptera such as vespids depend largely on the fertility of the foundresses, which, in turn, is a key factor in the context of biological invasions. The native European hornet *Vespa crabro* (Vc) and the invasive Asian hornet *Vespa velutina* (Vv) have generally similar ecological traits, e.g. nesting and feeding habits, although they differ in colony size, which is higher in Vv. Furthermore, in contrast to Vc, Vv is more specialized in its predatory habits, intensively hunting honey bees at the hive. Comparing the morphological and reproductive traits of two closely related species occupying the same ecological niche, one of which is a native species and the other an alien, can help us to gain an understanding of the invasion process. To this end, we here compare reproductive (ovarian size and maturation, fat level, spermatheca size and sperm stock, fecundity) and morphological (head size, weight) traits of the foundresses of these two hornet species. We observed that ovarian maturation began approximately one month earlier in Vv than in Vc, and that the fat level in the former was lower. We found twice the number of sperm in the mated foundresses of Vv than in those of Vc (more than 100×10^3 and less than 50×10^3 sperm, respectively), in a 16% smaller spermatheca in Vc. Furthermore, the sperm of Vv was found to be 65% shorter than that of Vc. The precocity and higher potential fecundity of Vv queens may have favoured this species over Vc in terms of predatory behaviour, and thereby contributed to its invasiveness.

Keywords: *Vespa velutina*, *Vespa crabro*, spermatheca, sperm stock, ovarian maturation, fat reserves, species competition

Introduction

The proliferation of an alien insect generally has detrimental effects on native species in the invaded area, particularly in terms of competitive exclusion when they have similar ecological niches (Mooney and Cleland 2001). Reproductive potential is recognized as key factor in understanding population dynamics and the potential for invasiveness (see, Moller 1996; Sakai *et al.* 2001 for a review). We might expect alien species to possess promoting traits linked to invasiveness (such as dispersal, fecundity *etc*) more developed than non-invasive ones, that will enhance population growth, including dispersal, establishment, and proliferation (Hudina *et al.* 2014, Chapple *et al.* 2012; Holway and Suarez 1999; Blackburn *et al.* 2009; Weis 2010, Monceau *et al.* 2015a). These life traits allow invasive species to outcompete the local species, thereby facilitating more successful invasion. Given the adaptability conferred by their sociality, social insects are good candidates for biological invasions (Moller 1996; Suarez *et al.* 1999; Cervo *et al.* 2000; Beggs *et al.* 2011). The European hornet *Vespa crabro* (Lin. 1758) is the only hornet originally distributed in Continental Europe (Archer 1994). This species is protected in some European countries for its ecological value (for example in Germany), and was considered an endangered species even before the arrival of *Vespa velutina* in Europe (Erlandson, 1988). The Yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina* var. *nigrithorax* (Lepelletier 1835), is native to East Asia, and was accidentally introduced to South France from China around 2004 (Monceau *et al.* 2014a, Arca, 2015). The introduced *V. velutina* (Vv) subsequently spread to neighbouring European countries, including Spain, Italy, Portugal, Belgium, and Germany, and has more recently been recorded in England and Scotland (Monceau and Thiéry 2017). The ecological niche of Vv is very similar to that of *V. crabro* (Vc): they both hunt arthropods, are scavengers, and consume ripe fruit. However, due to its larger colonies and outbreaks in the invaded areas, Vv has an enhanced impact on the local biodiversity. Furthermore, although reports of predation on domestic honeybees by Vc are largely anecdotal (Baracchi *et al.* 2010), Vv predaes them in huge amounts, including both imagoes and larvae (Matsuura and Yamane 1990, Monceau *et al.* 2013c). The mass hunting of bees by Vv is therefore an additional threat to the beekeeping industry, which is already in crisis owing to multifactorial causes (Oldroyd 2007; Flynn 2008; Brown & Paxton 2009; Kluser *et al.* 2010, Le Conte

Axe 1

et al. 2010, Tan *et al.* 2007). Several species of Asian hornets are known to attack honeybee colonies, using collective hunting strategies of varying degrees of sophistication (Matsuura *et al.* 1990), even if hives do represent a risky resource to exploit, since honeybees are defensive and can sometime kill the hunters (Tan *et al.* 2012, Arca *et al.* 2014). One hypothesis for the paucity of bees predation by Vc is that a Vc nest produces low numbers of workers, which is not conducive to risky attacks on hives. The capacity to produce large number of workers could thus be a key factor in optimal exploitation of such a resource. Monceau *et al.* 2015a showed that the seasonal phenologies in Vv and Vc overlaps to some extent. Even if they do not compete directly for food sources, either direct or indirect interspecific competition between these two species at the initiation stage is likely. Vc prefers cryptic sites for nest construction (Langowska *et al.* 2010), whereas mature Vv nests are mostly found in open sites, typically in tree canopies (Monceau *et al.* 2013a, 2014a). Nevertheless, numerous Vv colonies are initiated in roofs and underground, and two month later, some of those colonies relocate to more open sites (Matsuura and Yamane 1990). During this critical period of nest initiation, it seems probable that interspecific competition would occur. Monceau *et al.* (2015b) compared several behaviours of Vc and Vv foundresses, including aggressiveness and exploration, and showed that Vv outperforms Vc in such traits, which can be advantageous for invasion and competition with Vc. In the present study, we compared different fertility traits of the two hornet species that are prerequisites for larger colonies, and could thus increase or reduce the impact of the invasive Vv, not only on Vc, but also on honeybees.

The fertility of social Hymenoptera with an annual cycle, such as *Vespa* species, depends on different criteria, notably the number of eggs produced (Fletcher and Ross 1985; Reeve 1991; Reeve and Nonacs 1992, Foster *et al.* 2004), physiological investment in reproduction through ovarian development (Cini *et al.* 2013, Makino 2016), and precocity in establishing and developing a colony. In *Vespa* species, the eggs are laid by a single queen, whereas hormonal castration of the workers prevents them from mating and laying eggs (Foster *et al.* 2000). If the queen disappears for any reason, some workers can undergo ovarian maturation but will lay only unfertilized eggs (Matsuura and Yamane 1990). All females develop from fertilized eggs (diploid), whereas the males develop from unfertilized eggs (haploid). The queen's fertility therefore influences the size and the structure of

Axe 1

the colony (Takahashi *et al.* 2002), and sperm stored by queens after copulation are an essential resource for the production of workers and colony growth. In this regard, sperm morphology should also be taken into consideration because longer sperm occupies more space, and thus an equal spermathecal volume would contain less long sperm than short sperm.

Hornet gynes remain in their nest for a short period after emergence to increase their fat reserves, which will serve for both hibernation and egg production (Matsuura 1984, Matsuura and Yamane 1990, Martin 1993). After mating, the gynes conserve the sperm compacted in their spermatheca for the rest of their lives. The size and shape of the female spermatheca are species-specific (Gotoh *et al.* 2008), and in *Vespidae* comprises a single epithelial layer, subdivided into three main regions: a globular reservoir, a spermathecal duct, and a Y-shaped spermathecal gland (Martins *et al.* 2005). After hibernating, and a short period of food collection, ovarian maturation occurs for the duration of reproductive life (Matsuura 1984, Matsuura and Yamane 1990, Makino 2016). The queen (foundress) subsequently establishes a colony, and gradually uses spermatozoa to fertilize (or not) the eggs she is laying.

The objective of this study was to answer the following questions related to the fertility of queens of two European hornet species, the native *V. crabro* and the invasive *V. velutina*. (i) What is the proportion of foundresses that are fertilized in spring in each species? (ii) Are there differences between *V. velutina* and *V. crabro* in the spermatheca and the characteristics of its contents? (iii) Are there differences in the timing of ovarian maturation in the two species? Obtaining insights on such aspects is not only very important for gaining an understanding of the invasiveness of *Vv* but is also of general interest, as it addresses the problem of biological invasions, one of the current major threats to native wildlife. Moreover, to date, the reproductive biology of hornets in Europe has been poorly investigated. This study is based on an examination of 237 hornet queens (184 *Vv* and 53 *Vc*) in which we measured size and weight, described their sexual maturation, measured their spermatheca diameter, and assessed the amount and morphology of spermatozoa contained in their spermathecae.

Axe 1

Material and methods

Insects

Foundresses of the species *Vespa velutina* (VV) and *V. crabro* (VC) were collected from 9th March 2015 to 21st May 2015 (VV = 182, VC = 22), and from 18th March 2016 to 11th May 2016 (VV = 107, VC = 31). All the foundresses were captured using bottle food traps (lager containing 5% red fruit syrup) at different locations in the vicinity of Bordeaux (France) (for more details, see [Table 1](#)). Before being dissected, the insects were maintained for 1 to 48 h in plastic boxes (10 × 20 × 15 cm) within a climatic chamber at 23 ± 1°C, LD 12/12, and were provided with *ad libitum* water and honey.

Dissection and measurements

The hornets were killed by cooling in a freezer for 5 min, without degrading the sperm, so that they could be weighed using an electronic balance (AS 220/C/2; Radwag 2011, Poland) immediately prior to dissection.

- Head width

The head width of the hornets was measured using an electronic calliper (0–150 mm, Stainless hardened, e = 0.01 mm) at the largest distance between the eyes.

- Fat level

Under a stereomicroscope (OLYMPUS SZ61), the abdomen of the insect was separated from the remainder of the body, and was then immobilized with dorsal face uppermost on a dissection surface. The sternites were then removed, thereby enabling the fat level to be assessed, as described for *Polistes* in [Beani et al. \(2011\)](#). The amount of fat was classified based on a scale from 0 to 4, with 0 indicating the absence of extra fat and 4 representing an abdomen filled with fat. All the measurements were performed by a single experimenter (JP) to limit observer bias.

- Ovary development

After removing the superficial abdominal fat with clamps, the number of ovarioles that constitute each ovary was assessed. Ovarian development was assessed by evaluating the stage of the ovarioles, as described in [Beani *et al.* \(2011\)](#). This evaluation is illustrated in [Figure 1](#). To assess if the queen had already laid eggs, we looked for the remains of yellow bodies in the lower portion of the flat ovarioles (S), as evidence of previous egg laying. The number of eggs in each ovariole ready to be laid was also counted. To determine if an egg was ready (O), we initially examined its colour: eggs at this stage change from a cream colour to a characteristic pearly colour. We also compared the size of the egg with the average size of the eggs that could already be observed in the tractus (stage OV).

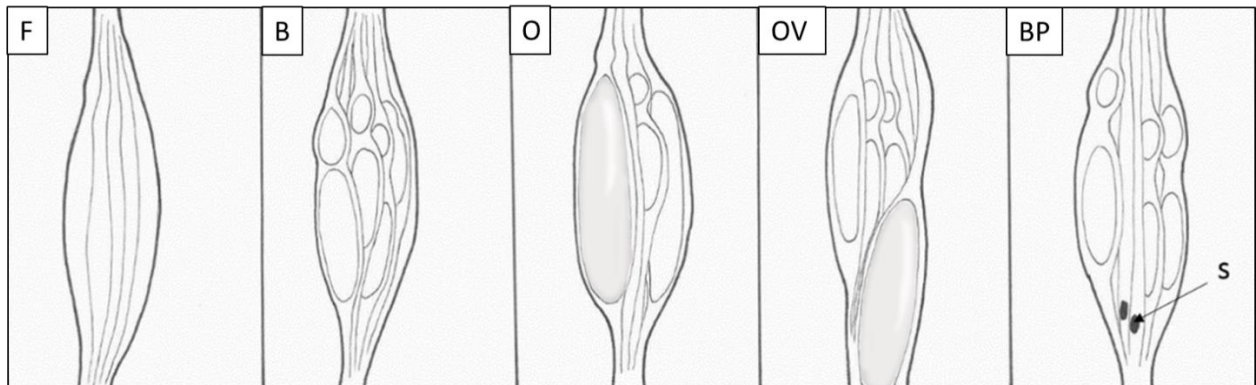


Fig 1. Ovariole development stages: F: flat ovarioles (one side), B: oocytes in formation, O: eggs, OV: eggs already in the oviduct, BP: no egg ready, but egg(s) already laid, S: spots of yellow body residuals from previously laid eggs. (Schema J. Poidatz).

- Spermatheca size

The spermatheca was extracted from the abdomen using precision clamps (Dumont, 55I). The spermatheca was then placed in a drop of Ringer's solution on a microscope slide. Photographs were taken using a camera (CAMEDIA C-7070) at magnification $\times 6$ ([Figure 2](#)). The diameter of the spermatheca reservoir ([Fig. 2AB a](#)) was measured using the ImageJ1® image processing Software. In

Axe 1

order to avoid a year effect, when comparing the weight and the spermatheca diameter of the two species, we applied a correction factor, obtained by dividing the spermatheca diameter by the head width of the queen. For six specimens of *V. crabro*, we were unable to take good enough photographs of the spermatheca, and thus only 48 queens of this species were used for this part of the analysis.

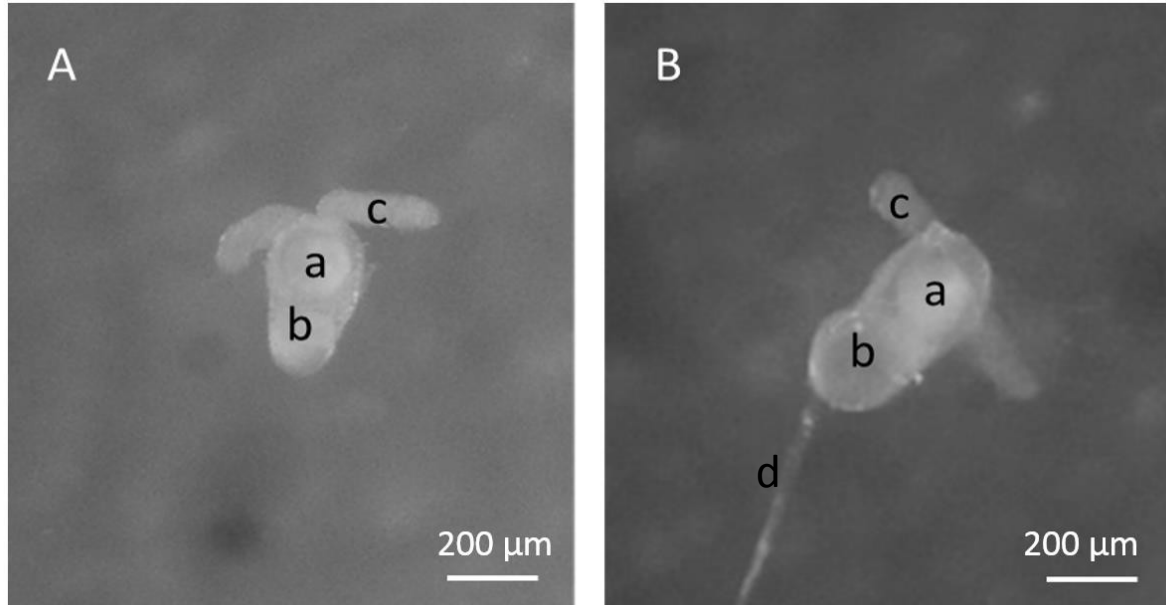


Fig. 2. Photographs of the spermatheca of *Vespa velutina* (A) and *V. crabro* (B) containing a condensed mass of sperm (a) in the reservoir (b), and the spermathecal accessory gland (c). The spermathecal duct is visible in *V. crabro* (d).

- Sperm count

After removing the external spermatheca envelope, the spermatheca content was spread in a drop of Ringer's solution by pressing it with clamps. The sperm fixation method described for parasitoids by [Bressac and Chevrier, \(1998\)](#) was applied. This method consists of a homogenization of the mix by clamp rotation, ethanol fixation, and DNA staining using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). This method has previously been used for counting sperm in seminal vesicles and for a description of spermiogenesis in male *V. velutina* ([Poidatz et al. 2017](#)). Having initially counted sperm five times on two slides, in 5, 10, and 15 microscope fields, we decided to count sperm in 10 microscope fields (Average spread = 25%). We counted all the visible sperm nuclei, except those in which half of the

Axe 1

nuclei was missing. Although this led to reduced numbers, it prevented sperm loss or destruction during successive manipulations. For four urban *V. velutina* queens, we were unable to perform a sperm count. Sperm length was assessed in 15 randomly selected individuals in each species. In total, the sperm and nuclei lengths of 130 spermatozoa of *V. velutina* and 150 spermatozoa of *V. crabro* were measured from photographs (magnification $\times 100$) using ImageJ1® software.

Statistics

Results are presented as the means $\pm$ SD. Analyses were performed using R 3.2.2 statistical software. A Shapiro test was used to assess the normality of the data. To assess the strength of the explanatory variables, we performed an ANOVA for the continuous variables or a GLM for discrete variables, with the fixed effects being 2015 or 2016, the species (*V. crabro* or *V. velutina*), and the sampling site category for *Vv* (urban or rural). To compare sperm length, number, and morphological characteristics, a Student's t-test was used when the data were normally distributed; otherwise, a Kruskal–Wallis test was used. To examine the correlation between different parameters, we used a Pearson correlation test if the arguments had a normal repartition, and a Spearman correlation test if at least one argument did not. For the comparison of fat level between species, which was based on a visual scale, we used a Wilcoxon rank sum test.

In the comparison between species, a correction factor obtained by dividing by the head width was applied for the weight and the spermatheca diameter to avoid a year effect.

Results

Interspecific comparisons (means $\pm$ SD)

The **head width** was significantly smaller in *Vv* than that in *Vc* (respectively mean $\pm$ SD: 5.83 ± 0.09 mm and 6.66 ± 0.27 mm; t-test, $p < 0.0001$, $N = 237$). For both species, individuals heads were smaller in 2016 (*Vv*: 5.82 ± 0.09 mm and *Vc*: 6.53 ± 0.22 mm) than in 2015 (*Vv*: 5.84 ± 0.09 mm and

Axe 1

Vc: 6.90 ± 0.16 mm) [t-test $p = 0.01$ for Vv ($N = 184$) and $p < 0.001$ for Vc ($N = 53$)]. The queens of Vv and Vc **weighed** 540.38 ± 77.48 mg and 985.12 ± 150.71 mg, respectively (significant difference: t-test, $p < 0.001$, $N = 237$). See [Fig 3.a](#) for an illustration.

The **spermatheca diameter** corrected by the head width of Vv queens (0.09 ± 6.10^{-3} mm, $N = 184$) was significantly lower than in Vc ($0.10 \pm 5 \times 10^{-3}$ mm, $N = 48$), (t-test, $p < 0.001$).

The **amount of sperm** in Vv spermathecae ($111.56 \pm 29.65 \times 10^3$ sperm) was significantly higher than that in Vc ($48.26 \pm 19.19 \times 10^3$ sperm), (Kruskal–Wallis test: $k = 123.74$, $p < 0.001$, $N = 237$) ([Figure 3.b](#)).

The average length of Vv spermatozoa (122.17 ± 19.99 μ m) was smaller than that of Vc (201.68 ± 26.86 μ m) (Kruskal–Wallis test: $k = 206.26$, $p < 0.001$, $N = 280$). Sperm nuclei length was, respectively, 12.31 ± 1.30 μ m and 14.61 ± 1.25 μ m [t-test: $p < 0.001$, 95% CI (1.992; 2.594), $N = 280$].

The **fat level (category)** of Vv queens (2.78 ± 0.67) was significantly lower than for Vc queens (3.43 ± 0.61) (Wilcoxon rank sum test, $p < 0.001$, $N = 204$). A strong correlation was found between foundress fresh weight and fat level (Spearman test, $p < 0.001$). The fat level did not change with time in Vv queens during the sampling period ($R=0.072$, least square, $t=0.07$, $p=1$, $n=185$). Moreover, when we compared the fat level of Vv queens trapped in the first month in 2015 with that of Vc, we again observed a lower fat level in Vv, with less variability (Wilcoxon rank sum test with continuity correction: $W = 2176.5$, $p < 0.001$, $NV_v = 53$, $NV_c = 48$).

Axe 1

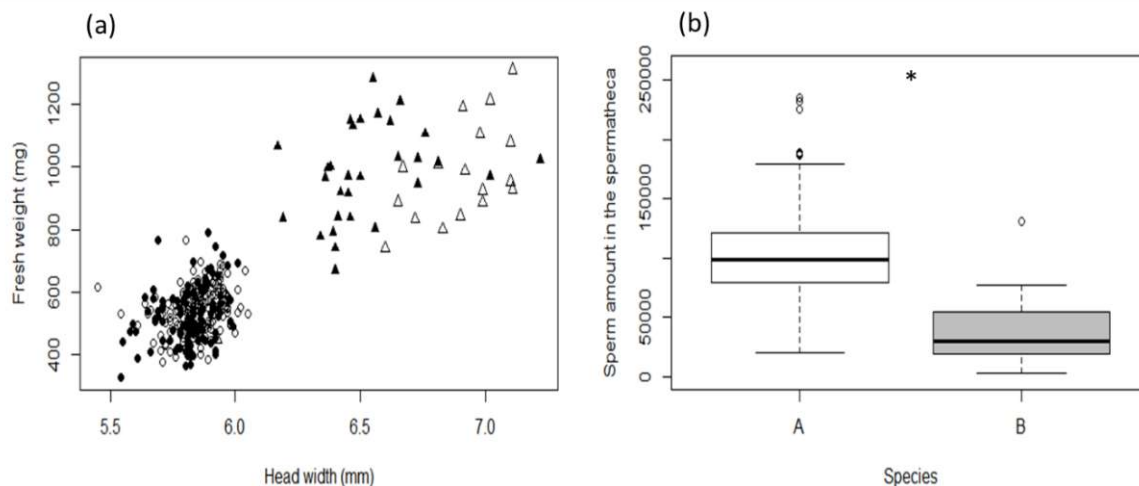


Fig. 3. (a) Head size as a function of fresh weight in the foundresses of *Vespa velutina* (circles) and *V. crabro* (triangles) in 2015 (white) and 2016 (black). **(b)** Total amount of sperm in spermathecae of the foundresses of *Vespa velutina* (A) and *V. crabro* (B) Kruskal–Wallis test $P < 0.05$.

Among the ovaries dissected from 53 Vc foundresses, we observed 50 ovaries with 16 ovarioles and three ovaries with 14 ovarioles. We observed 16 ovarioles in all the ovaries dissected from 184 Vv foundresses. Ovarian development began approximately 15 days earlier in Vv than in Vc. Furthermore, Vv queens carrying three eggs ready to be laid in their ovarioles were found one month earlier than Vc queens. At the end of the sampling period, we observed a maximum of seven eggs in Vv ovarioles, but a maximum of only three in Vc. The maximum egg production in the ovarioles of Vv. queens was observed in the second half of April in spring 2015, and at this time, yellow bodies were visible in the ovarioles of some Vv queens, indicating that they had begun to lay eggs.

Correlations between the different parameters

The data obtained from correlation matrices for the two species are summarized in Table 2. In Vv, we observed significant correlations between head width, sperm contained in the spermatheca and spermatheca diameter. In Vc, a significant correlation was observed between weight and spermatheca

Axe 1

diameter. In both species, we observed a correlation between weight and head width (tendency for Vv), and a significant correlation between weight and sperm content in the spermatheca.

Table 2. Correlation matrix of the different parameters observed in foundresses of the hornet species *Vespa velutina* and *V. crabro*. ●: $p > 0.05$, ■: $p > 0.01$. Abbreviations: Head = head width, Weight = fresh weight, spt diam = spermatheca diameter, sperm = amount of sperm in the spermatheca. p= Pearson correlation test, s = Spearman correlation test.

	<i>V. velutina</i> (N = 289)				<i>V. crabro</i> (N = 53)			
	Head	Weight	spt diam	sperm	Head	Weight	spt diam	sperm
Head	-	■0.013	●0.659	●0.095	-	●0.931	0.003	0.9×10^{-5} s
		p	p	s		p	p	
Weight	■0.013 p	-	0.006	●0.380	●0.931	-	●0.61p	●0.185 s
			p	s	p			
spt diam	●0.659 p	0.006 p	-	0.0005	0.003 p	●0.616	-	0.005 s
				s		p		
sperm	●0.095 s	●0.380 s	0.0005	-	0.9×10^{-5}	●0.185	0.005 s	-
			s		s	s		

Discussion

The Vv queens were 79% lighter than Vc queens and their head width was on average 18% smaller, which is consistent with the species descriptions by Linnaeus (for Vc) and Lepelletier (for Vv). For both species, all the queens captured during spring were found to be mated. The spermathecae of the two hornet species observed here had the same approximately spherical shape, and differed only in size, being 16% larger in *V. crabro*, which is a very similar proportion compared with this insect's total size. This is consistent with the known morphology of spermathecae in Vespids (Martins *et al.* 2005). The sperm morphology was very similar in the two *Vespa* species, being thin, elongated, and slightly curved, which is consistent with the observations of Mancini *et al.* 2009. Compared with the sperm of Vc, those of Vv were 65% shorter with an 18% shorter nucleus, but were 43% more

Axe 1

numerous. Initiation of egg production and oviposition were one month earlier in Vv than in Vc. *Vespa crabro* had higher fat reserves with a smaller amount variation than Vv, in correlation with its total weight.

In addition to outperforming Vc in behaviours potentially related with nest initiation (Monceau *et al.* 2015b), our study demonstrates that Vv also outperforms Vc in egg production timing. However, it should be noted that we measured egg production at the beginning of the cycle during the sampling period (for illustration, a detailed description of the development cycle of *Vespa affinis* is presented by Martin 1991), and thus the foundresses had not attained their maximal egg production rate. Accordingly, we are unable to predict the final egg production based on the measurements made in the present study. Furthermore, the yellow bodies observed in the ovarioles of Vv queens are evidence of oviposition, but cannot be used to determine the number of egg laid, as demonstrated by Cini *et al.* 2013. The fate of egg maturation should be linked to nest foundation. As mentioned in the introduction, a significant proportion of the mature Vv nests are found in relatively cryptic sites (Rome *et al.* 2011), and are thus potentially suitable for Vc, and a large proportion of the Vv nests are initiated in such sites before relocation. Competition during this critical period would appear to be plausible. As the number of produced gynes is considerably higher in Vv compared with Vc, (spring trapping, Monceau *et al.* 2012), this would enhance the potential efficacy of such occupation. The time differential in the reproductive cycle of Vv and its high fecundity could therefore be advantageous to this species in terms of founding and defending nest sites. Indeed, the timing of worker production is linked to the timing of colony foundation: ‘first come first served’. The workers will defend the nest, explore, and locate resources with very limited competition during this initial period, which is a key factor for potential colony expansion. The early production of Vv workers could thus be advantageous in terms of colony defence against the larger Vc queens at the beginning of the colony cycle, the latter of which could attempt to usurp nests already founded by the congeneric Vv. Although interspecific usurpation of colonies between *V. velutina* and *V. crabro* has yet to be reported, it is not so rare in vespids species (Spradbery 1973, Edward 1980, Matsuura and Yamane 1990, Cervo *et al.* 2004).

Axe 1

In addition to local exclusion for nest initiation where the two species are present, which may involve a substantial proportion of the *Vc* foundresses, there may also be temporal exclusion. Accordingly, to counter the aggressiveness and strength of *Vc*, *Vv* seemed to have developed a strategy based on rapid reproduction of large numbers of individuals. The high precocity of *Vv* in its ovarian function and the larger stock of sperm allow this species to produce more workers earlier, which can compete with other vespids for resource collection. Numerous cases of aggressive interaction between *Vc* and *Vv* workers have been observed at feeding sites (D. Thiéry, pers. Obs.). This precocity of *Vv* may also be advantageous with respect to feeding on bee colonies. For example, when hunting as a group, *Vv* workers could benefit from rapidly reducing beehive defences, thereby ensuring a longer and safer hunting period. The high quality of such resources would undoubtedly contribute favourably to the number and quality of the next generation of *Vv* reproducers, as has also been hypothesized by [Matsuura \(1988\)](#).

Our finding of a lower variation in the levels of fat reserves in *Vc* compared to *Vv* could be biased by the lower number of sampled queens in this species ($N = 54$ *Vc* vs. N *Vv* = 183). However, we can assume that during initiation period, the fat level is a critical parameter amongst the life traits of the foundresses. Low fat level could have several repercussions, including a lower number or size of eggs, a higher requirement for sugar at this period, and less resistance to climatic variation ([Strohm, 2000](#); [Toth 2005](#); [Weissel et al. 2012](#)). A paucity of fat in *Vv* could be compensated by the production of a higher number of gynes compared with *Vc*. The fact that the fat level did not vary with time in the captured *Vv* queens could suggest that the queens with fat reserves lower than level 2 in our analysis did not survive through winter, possibly explaining why we found only 2.65% of the dissected *Vv* foundresses in this case. Alternatively, it could indicate that in this environment, the queens of *Vv* are able to maintain or enhance their fat level above the level 2 in our scale (*i.e.* there is sufficient rich resources available).

Recently, [Kovacs et al. \(2012\)](#) suggested that ‘mating should not adversely affect female viability in social insects’. We can thus assume that a large majority of the queens in these species are fertilized in the autumn, or that unfertilized gynes do not overwinter. To date, *Vv* matings *in natura*

Axe 1

have all been observed at the end of autumn, on the ground adjacent to nests (J. Poidatz, O. Bonnard pers obs) or on the ground under or adjacent to nectariferous plants (J. Poidatz, pers obs.; K. Monceau pers com.).

The observation that there was two times more sperm in the spermathecae of Vv than in those of Vc is consistent with the following observations. (1) **Population size:** colonies of Vv are considerably larger than those of Vc, with 15000–30000 individuals annually produced in Vv colonies and 700–1400 individuals produced in Vc colonies (Nadolski 2012; Rome *et al.* 2015). (2) **Mating number:** multiple mating occurs in Vv as demonstrated by Arca (2012). There are on average 2.4 matings per gyne in Vv, (a maximum of 8 in France), and the first queen introduced into Europe was mated in China by at least 5 males prior to its introduction (Arca 2015). In contrast, only approximately 1.1 matings per gyne have been described for Vc (Foster *et al.* 1999, Spiewok *et al.* 2006). (3) The **spermatozoa** of Vv are 0.65 times shorter than those in Vc and are more compacted within the reservoir. Compared to spermatozoa stored by females, Vv males had sperm in large excess (Poidatz *et al.* 2017). Sperm could exhibit morphological variations as a consequence of selective constraints on male paternity by sperm competition (Wedell *et al.* 2002; Snook 2005) due to frequency of female multiple matings. The shorter sperm in Vv is consistent with selection of high concentrations in ejaculates, whereas the longer Vc sperm would be less constrained by numbers because females typically mate only once. The multiple mating observed in Vv foundresses is a particular characteristic compared to other *Vespa* species (Strassman 2001, Cole 1983), and is a very useful life trait for an invasive species, as illustrated in the case of the single queen introduced into France (Arca 2012). Multiple mating in Vv could be a strategy to ensure both high potential fecundity and general brood genetic diversity, as has been observed for other social hymenopterans (Page and Metcalf 1982; Cole 1983; Crozier and Page 1985; Ross 1985; Ratnieks and Visscher 1989; Keller and Reeve 1994; Boomsma and Ratnieks 1996; Schmid-Hempel and Crozier 1999). The correlation observed in between the weight and the spermathecal content in both *Vespa* species is interesting, because it could suggest that heavier gynes could in some way optimize their mating(s), which has been observed in

Axe 1

fruit flies ([Blay and Yuval 2014](#)), or they may prove more attractive to potential mates. This last hypothesis has been demonstrated in moths ([Xu and Wang 2009](#)).

The problem of allelic diversity conservation has, nevertheless, to be raised here. In hymenopterans, multiple mating in populations with low diversity can cause consanguinity issues, and, for example, an increase in the proportion of diploid males in a population, which could lead to its extinction ([Zayed et al. 2004](#)). Diploid males are homozygous at the complementary sex determiner (*csd*) locus, and their cost to the colony growth is important, since, unlike workers, they do not forage or partake in brood care. Moreover, they often have low reproductive capacities ([Harpur et al. 2013](#)). In France, diploid males have already been detected in the *V. velutina* populations ([Arca 2012](#), [Darrouzet et al. 2015](#)). However, in some cases, invasive social insects can overcome the genetic load at the *csd* locus via balancing selection, as demonstrated for the invasive bee *Apis cerana* in Australia by [Gloag et al. 2016](#). This invasive population did experience a handicap due to diploid males, which was enhanced by the founder effect; however, rapid selection at the *csd* locus favoured equal allele frequencies. With regards to *V. velutina*, its multiple mating tendency could favour a similar balancing effect by enhancing the initial allele diversity in the inoculum and the selection of rare alleles at the *csd* locus, thereby diminishing the consanguinity effect.

The findings of this study bring to light several common traits but also differences in the fertility potential and fecundity of the queens of the endangered European hornet *V. crabro* and those of the invasive Asian hornet *V. velutina*. *Vv* queens are earlier in preparing eggs than *Vc* queens, and also have shorter but twice the number of sperm contained in a smaller spermatheca compared with *Vc*. The precocity and high fertility of *Vv* queens probably favours it over *Vc*, not only in terms of potential local exclusion during nest initiation, but also via temporal exclusion for territory and resource defence. The number, physiology, and precocity of *Vv* foundresses may have helped this species to compensate for its smaller size compared with the congeneric *Vc*. All these differences could explain the high brood production in *Vv*, and thus the high number of workers able to predate on bee hives. They also have important implications for the production of gynes in subsequent

Axe 1

generations. Collectively, these observations might explain the observed supremacy of Vv over Vc, and hence the rapid colonization of this invasive species across European countries.

Acknowledgements

We thank all the beekeepers of the Bordeaux area, Jean Paul Cros, Annie Manon, Claude Berry, Claude Delfau, and Yves Goteau, who assisted in the collection of hornet queens. Dr Rita Cervo and one anonymous reviewer are acknowledged for valuable comments on the manuscript. We thank Bayer Crop Science, represented by Dr. Bénédicte Laborie, for financial support to the first author. We also thank our native English-speaking colleague Avril Wellwood-Foucard for English language corrections.

A.2.2 Sélection spatiale ou « Spatial sorting hypothesis »

Lors d'une invasion biologique, les organismes invasifs sont soumis à différentes pressions de sélection au cours de leur installation, entraînant une évolution rapide de leur phénotype (Sax *et al.* 2005, Weiss-Lehman *et al.* 2017). Après leur arrivée dans un nouvel environnement, les traits de dispersion des organismes invasifs sont bien souvent sujets à des évolutions extrêmes : c'est l'hypothèse du « Spatial sorting », *i.e.* d'une évolution spatiale de certaines caractéristiques avec l'invasion (Travis & Dytham 2002). En particulier, il est supposé que sur les fronts d'invasion les capacités de dispersion et d'exploration les plus optimales sont favorisées (Phillips *et al.* 2008). Cette hypothèse génère des différences dans les capacités de dispersion à travers le temps et l'espace (Alford *et al.* 2009). Ce phénomène a par exemple été observé très peu de temps (moins de 10 ans) après l'invasion du crapaud buffle *Bufa marinus* en Australie (taille des pattes plus grandes et comportement de dispersion favorisé sur les fronts d'invasion (Phillips *et al.* 2007, Phillips *et al.* 2008, Alford *et al.* 2009)), ou encore chez la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* après son arrivée en Europe (ailes plus grandes sur les fronts d'invasion (Lombaert *et al.* 2014)), et très récemment sur le coléoptère *Callosobruchus maculatus* (Ochocki & Miller 2017). Chez les insectes sociaux, la dispersion se fait via les fondatrices, qui vont fonder leurs colonies plus ou moins loin de leur nid d'origine. C'est pourquoi nous testerons cette hypothèse de sélection spatiale sur des fondatrices de *V. velutina* en Europe. La relocalisation d'une colonie peut avoir lieu dans la première phase de développement de la colonie (voir **Introduction** et **Axe 2**) mais reste dans un environnement proche ; le transport passif d'une colonie entière est peu probable, mais les fondatrices seules peuvent aisément être transportées passivement, surtout pendant leur phase hivernante, le plus souvent dans du bois.

Si les paramètres de dispersion et de reproduction des frelons asiatiques suivent l'hypothèse évolutive du Spatial sorting, des variations entre les *V. velutina* issus de diverses régions envahies il y a plus ou moins longtemps devraient pouvoir être isolées. Le protocole et les premiers résultats des expérimentations sur le sujet sont présentés en **Annexe 1.1 et 1.2**.

A.2.3 Une sélection spatiale existe-t-elle chez *Vespa velutina* ?

Les protocoles et résultats préliminaires des expérimentations menées ou prévues pour étudier ce phénomène évolutif chez *V. velutina* en Europe sont regroupés en [Annexes 1.1 et 1.2](#). Nous présentons néanmoins ci-après un résumé de leur principe et des principaux résultats.

Résumé

L'aire de répartition du frelon asiatique invasif *V. velutina* augmente de manière particulièrement rapide en Europe, interrogeant quant aux possibles facteurs favorisant sa dispersion. Ces facteurs peuvent jouer de manière directe sur l'insecte (capacités intrinsèques, paysage, ressources, climat) mais également indirecte, par transport passif par l'homme. L'hypothèse évolutive du « **Spatial sorting** » suppose l'existence d'un phénomène de sélection très rapide à travers le temps et l'espace de traits dispersifs chez des organismes invasifs. **Cette hypothèse s'applique-t-elle à *V. velutina* ?** Chez cette espèce comme chez tous les vespides, la dispersion se fait par les fondatrices pendant leur **phase solitaire**, i.e. à l'Automne après leur accouplement lors de la recherche de site d'hibernation, et au Printemps en sortie d'hibernation lors de la recherche de site d'initiation de leur colonie. Les frelons sont des **insectes volants**, et une grande part de leurs capacités dispersives reposent sur leur taille, la taille de leurs ailes, et la quantité de muscles alaires (dans leur thorax).

Dans une première étude préliminaire, une comparaison triple de traits de fertilité et de dispersion de fondatrices de *V. velutina* entre trois zones envahies depuis plus ou moins longtemps (Aquitaine, France >11ans ; Bretagne, France ~5-6 ans et Ligurie, Italie ~1an) a été réalisée au printemps 2016. Nous avons posé l'hypothèse dans cette étude qu'une évolution spatiale puisse être détectée chez les reines de *V. velutina*, qui favoriserait des meilleurs traits dispersifs dans les sites les plus récemment envahis, et des meilleurs traits reproductifs dans les sites les plus anciennement envahis. Dans cette première étude, nous avons ainsi capturé 388 fondatrices au total dans ces trois zones, et avons comparé des traits liés à la fertilité (leur maturation ovarienne, leur stock de spermatozoïde dans leur spermathèque, ainsi que leur quantité de corps gras), et des traits liés à leur dispersion (taille, poids, envergure, taille/poids du thorax en proportion avec le reste du corps). De nombreuses différences sur

plusieurs indicateurs pouvant avoir des conséquences importantes sur les dynamiques invasives de *V. velutina* dans les trois régions envahies plus ou moins tardivement ont ici été mises en évidence. Les fondatrices italiennes sont plus petites et légères, avec un thorax plus lourd proportionnellement et des ailes plus courtes que chez les françaises. Les reines Italiennes stockent également plus de gras et de spermatozoïdes, et semblent donc contrairement à notre hypothèse, avoir des capacités reproductives au moins aussi performantes que les Françaises. Aucune similitude n'a pu être observée entre la Ligurie et la Bretagne, pourtant les plus récemment envahies, la Bretagne s'avérant être plus proche de l'Aquitaine pour tous les traits observés. Mais l'identification des causes sous-jacentes ayant entraîné ces différences reste ici difficile à établir, tout comme leur interprétation et les implications dispersives engendrées. De plus l'évolution spatiale de certains traits pourrait ici avoir été modifiée par des effets environnementaux (climat, ressources) ou liés au transport passif qui pourrait court-circuiter une potentielle évolution.

Suite à cette première étude nous confirmant que des différences morphologiques existent bien chez *V. velutina* au moins dans trois sites à travers l'Europe, nous avons cherché à répondre de manière plus précise à la question de l'existence d'une sélection spatiale de traits dispersifs chez *V. velutina* et de faire la part des facteurs climatiques et de transport passif dans leur expression. Ainsi nous avons proposé dans une **deuxième étude** de travailler sur des échantillons bien plus importants **répartis de manière homogène dans toute l'Europe**, et recouvrant différents climats. Pour cela, nous avons lancé une **campagne internationale de collecte de reines de frelons au printemps 2017** grâce à un projet de science participatif nommé « **Eurofrelon** ». Un site internet multilingue (<https://sites.google.com/site/eurofrelon/home>) et une diffusion des directives à l'échelle nationale et internationale ont permis de récolter environ 6 000 fondatrices provenant de 250 sites à travers l'Europe. Nous allons associer des mesures morphologiques et génétiques pour ces échantillons, afin de voir apparaître des potentiels patterns évolutifs et la présence de pression de sélection dans les populations de front d'invasion, et de faire la part de la dispersion liée à une évolution intrinsèque des frelons, du climat, et du transport passif par l'homme. Ce projet, lancé cette année en partenariat avec le CNRS de Toulouse (col M. Liohreau et A. Wystrach), devrait pourvoir commencer à fournir des premiers résultats l'année prochaine.

A.3 Description du comportement de reproduction de *V. velutina*

A.3.1 La reproduction chez les frelons

La constitution d'un stock de spermatozoïdes disponibles pour la fertilisation des œufs est une étape clé de la reproduction pour les espèces comme les frelons, qui ne s'accouplent qu'à un seul moment de leur vie (Page & Metcalf 1982). L'étude du comportement de reproduction chez un insecte social passe par la description de plusieurs paramètres, tels que le choix du site de reproduction, le choix du partenaire, la fréquence de reproduction par mâle et par femelle pendant la période reproductive, les processus d'attraction (parades), les conditions environnementales (température, humidité) et physiologiques (âge, hormones) optimales *etc...* (Cole 1983). Il existe différentes étapes dans ce comportement : la recherche ou attraction du partenaire (odeurs, couleurs, présents), l'acceptation de l'accouplement, l'accouplement (transfert de gamètes), la fin de l'accouplement. Une fois l'enchaînement de ces comportements et les paramètres jouant dessus établis, une modélisation précise de l'impact de modification de différents paramètres pourra être réalisée. Peu d'études existent sur ce sujet concernant les vespides, à part *Mischocyttarus drewseni* (Jeanne & Bermúdez 1980) et un travail assez général sur abeilles et guêpes (Alcock *et al.* 1978).

Chez *V. crabro* ainsi que chez *V. mandarinia*, il a pu être démontré que les reines produisent des phéromones attractives pour les mâles (Batra 1980). La présence de macro glomérules dans les lobes antennaires du cerveau des mâles de *V. velutina* laisse supposer que de telles phéromones existent et qu'elles auraient une fonction importante chez cette espèce (Couto *et al.* 2016).

Les reproductions multiples chez les frelons sont rares, avec par exemple des nombres d'accouplement moyens de 1.1 par reine chez *V. crabro*, et de 1.3 chez *V. mandarinia* (Foster *et al.* 1999). Les reines de *V. velutina* s'accouplent pourtant en moyenne 2.4 fois, avec un maximum de 8 observé (Arca 2012) : cet investissement dans la reproduction semble donc particulièrement élevé chez cette espèce de frelon, et pourrait expliquer en partie les très fortes populations observées (> 15000 individus par

Axe 1

colonie). Bien souvent de très fortes capacités de reproduction vont de pair avec de fortes capacités d'invasion ([Moller et al. 1996](#)).

Chez les hyménoptères, les sites où se déroulent les accouplements sont très diversifiés selon les espèces. Ils peuvent se dérouler (1) **près des nids** : par exemple chez *V. mandarinia*, les mâles attendent la sortie des gynes pour s'accoupler ([Matsuura 1984](#)), ou encore par exemple chez les abeilles, où les faux-bourçons effectuent une congrégation autour de la reine à sa sortie de la ruche lors d'un vol nuptial ([Heidinger et al. 2014](#)). L'accouplement peut également se situer (2) **sur des sites stratégiques** : de nourriture, comme le font les *V. crabro*, ou de passage, par exemple les mâles de bourçons patrouillent de feuilles en feuilles en attendant le passage d'une jeune reine. Pour *V. velutina*, le site exact des accouplements est encore mal connu, des témoignages ayant été rapportés d'observations sur des sites de nourriture (arbres mellifères, [pers. com. AAAFA](#)), mais également à proximité de nids ([obs. pers. J. Poidatz](#)). Contrairement à l'accouplement chez *Apis mellifera* qui a lieu en vol, les frelons s'accouplent au sol, avec une position caractéristique, dite « en S ». ([Figure 18](#)).



Figure 18: Accouplement de plusieurs espèces de frelons, avec la position en « S » caractéristique. A : *Vespa crabro* le frelon européen (Khruner ©), B : *V. mandarinia*, le frelon mandarin (Japan, Alastair Macewen ©), C : *V. velutina*, le frelon asiatique à pattes jaunes (Source [Choi et al. 2012](#)).

Le choix du partenaire peut se faire sur différents critères pouvant être physiques (taille, taille relative de certains organes, couleur), physiologiques (odeurs (phéromones), âge), mais également génétiques (appartenance à la même fratrie) ([Crozier & Page 1985](#))... L'âge de reproduction dépend du développement de l'individu, de sa stratégie de recherche de partenaire, et de l'acceptation par ce dernier. Chez certaines espèces, les accouplements sont des phénomènes sociaux qui impliquent de

Axe 1

nombreux partenaires : par exemple chez les abeilles, la jeune reine va effectuer des vols nuptiaux durant une semaine et s'accoupler en vol avec une congrégation de mâles (~20 accouplements) (Cole 1983, Palmer & Oldroyd 2000, Tarpy *et al.* 2004).

Tous ces éléments et leurs parts respectives dans la reproduction sont encore inconnus chez *V. velutina*, et nous avons tenté d'explorer leur caractérisation dans l'**Annexe 1.3** présentée ci-après.

A.3.2 Reproduction chez *Vespa velutina*

Nous avons tenté de répondre à plusieurs questions concernant la reproduction *V. velutina* grâce à des études comportementales en condition contrôlées. Nous avons voulu à la fois estimer la fréquence de reproduction des mâles et des femelles chez *V. velutina*, et évaluer les critères de choix du partenaire chez cette espèce (âge, proximité génétique, fertilité). Les expérimentations réalisées sont présentées en **Annexe 1.3**, dont voici un résumé.

Résumé

Afin de mesurer l'implication de certains paramètres liés aux choix du partenaire dans les accouplements chez *V. velutina*, nous avons effectué trois expérimentations. Dans la première, nous avons mesuré **l'évolution du comportement de couples suivant leur âge et leur origine** (intra ou extra-colonial), par analyse vidéo des 33 couples mis en présence 15 minutes dans des petites enceintes. Nous avons ainsi pu observer que l'agressivité des gynes envers les mâles augmentait fortement avec l'âge des gynes. Les deux sexes étaient caractérisés par des comportements très différents, les femelles étant plus agressives et plus enclines au toilettage et à l'immobilité, quand les mâles passaient le plus clair de leur temps à se déplacer et rechercher le contact antennaire avec les femelles. Seulement deux tentatives d'accouplement ont été observées dans cette configuration. Dans une deuxième expérimentation, nous avons mesuré **la quantité d'accouplements tentés par des mâles lorsqu'ils sont mis en présence en groupe avec une femelle immobilisée** dans une enceinte

Axe 1

assez grande. Nous avons pu observer plus d'une trentaine de tentatives d'accouplements dans cette configuration, 30 sur 33 reines ayant été sujettes à au moins une tentative d'accouplement. Certains mâles ont montré un comportement de gardiennage envers la reine. Deux mâles ont semblés devenir attractifs pour d'autres après avoir tenté de s'accoupler avec la reine (une tentative d'accouplement entre deux mâles a pu être observée). Enfin, les mâles ont tenté en général très rapidement de s'accoupler aux femelles, en moyenne 10 secondes après mise en présence de la femelle dans l'enceinte. Dans un troisième temps, **une femelle a été mise en présence avec plusieurs mâles cette fois-ci sans entraves, de manière à ce qu'un comportement plus « naturel » puisse être observé.** Le nombre de tentative d'accouplement observé a été bien inférieur à celui avec les femelles immobilisées, malgré tout quelques tentatives ont été observées. Contrairement aux observations effectuées dans la première expérimentation où les femelles étaient très agressives envers le mâle, les femelles étaient ici plus enclines à la fuite qu'à l'agressivité. Les couples ayant tenté de s'accoupler ont à chaque fois été disséqués, sans jamais parvenir à détecter de spermatozoïdes dans les tractus des femelles : nous n'avons pas su pour l'instant observer de réel accouplement chez *V. velutina*. **Des observations *in natura* devront être mise en place pour avancer dans la description et la compréhension du comportement reproductif chez *V. velutina*.**

AXE 2 : DE LA COLLECTE A L'UTILISATION DES RESSOURCES PAR LES COLONIES DE *VESPA VELUTINA*.

L'objectif des recherches présentées dans cet axe est de mieux comprendre l'organisation et le fonctionnement des colonies de *V. velutina*. Dans cet axe nous explorerons la manière dont s'organisent la collecte et la distribution des denrées alimentaires chez *V. velutina*, en nous intéressant à trois principaux leviers de connaissances. Tout d'abord nous étudierons **la manière dont les ouvrières choisissent leurs ressources** (sont-elles spécialisées dans la collecte de certaines ressources, ou bien opportunistes ?). Puis nous décrirons **la manière dont les ouvrières fourrageuses se déplacent autour de leur colonie**, en explorant en particulier leur rayon d'action et ses limites, ainsi que l'implication de facteurs climatiques dans la durée et la fréquence de leurs sorties du nid. Enfin, nous nous attacherons à étudier comment les ouvrières collectrices **distribuent la nourriture dans leur colonie**.

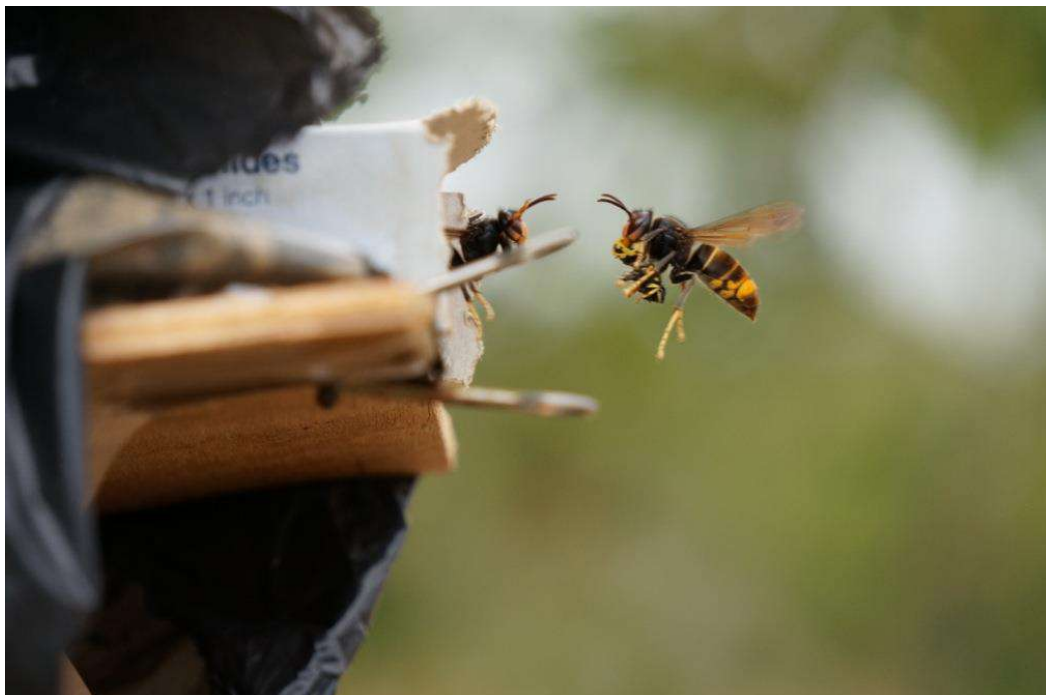


Photo de A. Girard INRA. Ouvrière de *V. velutina* rapportant une guêpe à sa colonie, où une ouvrière gardienne taguée l'accueille.

B.1 Nutrition de *Vespa velutina* et biologie des nids

B.1.1 Nutrition des adultes

B.1.1.1 Collecte de ressources chez les *Vespidae*

Les *Vespidae* sont majoritairement des insectes **généralistes**, capables de changer de sources alimentaires de manière opportuniste ; leur bol alimentaire varie ainsi suivant les années et les saisons (Jeanne & Taylor 2009). Pour leurs besoins personnels et celui des autres adultes de la colonie, les ouvrières collectent des ressources glucidiques et, pour la nutrition des larves de leur colonie, des ressources protéiques (Raveret Richter 2000, Spradbery 1973).

Les insectes sociaux comme les abeilles et les fourmis ont mis en place de nombreuses stratégies de communication pour optimiser leur collecte de ressource en partageant des informations sur leur localisation (dances (Dornhaus & Chittka 1999, Grüter & Farina 2009), phéromones de marquage de ressource (Beckers *et al.* 1989, Billen & Morgan 1988, Hölldobler 1978, Nicolis & Deneubourg 1999, Pankiw 2004)). Mais pour l'instant, aucun signal produit par une ouvrière de *Vespidae* ayant réussi à trouver une ressource intéressante n'a pu être mis en évidence, qui donnerait des indications sur la localisation de la ressource à ses consœurs (Jeanne & Taylor 2009). Ces auteurs proposent différentes hypothèses pour expliquer ce manque: (1) la taille de colonie chez les guêpes est trop petite pour que ce caractère évolutif se soit développé (Beckers *et al.* 1989), (2) les capacités de stockage des ressources dans les nids sont limitées (Portha *et al.* 2002, Dornhaus & Chittka 2004, Dechaume-Moncharmont *et al.* 2005) (3) les ressources recherchées sont souvent dispersées et éphémères, ce qui sélectionnerait des stratégies de collecte opportunistes opposées au recrutement (Raveret Richter 2000). La seule exception à cette règle connue étant *V. mandarinia*, où après plusieurs raids couronnés de succès, l'ouvrière marque la ruche ou le nid à attaquer avec une sécrétion de sa glande de van der Vecht,¹ ce qui va entraîner le recrutement de ses consœurs pour attaquer la colonie marquée (Matsuura 1984).

¹ Glande de van der Vecht : sixième glande sternale chez les *Vespidae* (Billen & Morgan 1998).

Pour autant, la plupart des *Vespidae* sont capables de fournir des éléments utiles pour guider la collecte de ressources de leurs consœurs autrement. Par exemple **(1) à la source de nourriture** grâce à la **facilitation sociale** (Wilson 1975) : la présence de consœurs ou d'espèces concurrentes sur un site de collecte peut mener, suivant les espèces, à une augmentation locale des collectes (Thorpe 1963) ou, au contraire, à une inhibition locale des collectes (Parrish & Fowler 1983, Raveret Richter & Tisch 1999). Ce mécanisme différerait suivant la taille de la colonie et surtout celle de l'insecte, et serait adapté au **vol de nourriture** (Raveret Richter & Tish 1999), aux communautés locales d'espèces, et à l'apprentissage individuel. Des indices peuvent également être laissés **(2) au nid**: Les ouvrières naïves de *Vespula germanica* et *V. vulgaris* apprennent par exemple dans leur nid l'odeur de nourriture riche, et utilisent cette information pour parvenir à en localiser la source (Maschwitz *et al.* 1974). Pour *V. germanica*, le dépôt de gouttes de sirop odoriférant (fruit) dans le nid suffit à en faire sortir des fourrageuses pour rechercher cette odeur (Overmyer & Jeanne 1998, Jandt & Jeanne 2005). Beaucoup de guêpes sociales, qui rappelons-le, ne produisent pas de miel, sont capables de stocker du nectar sous la forme de gouttes de liquide sucré sur les bords de cellules vides ou contenant des œufs (Hunt *et al.* 1998). Les colonies de *Polistes annularis* au Texas arrivent même à stocker suffisamment de miel dans leur colonie pour assurer la survie d'adultes durant l'hiver, après la dissolution de la colonie (Strassmann 1979). Dans certains cas, même des protéines peuvent être stockées : plusieurs espèces d'*Epiponine* accumulent ainsi des centaines de corps de fourmis ou de termites dans leurs colonies (Richards 1978). Il semblerait qu'en Corée, des cas de stockage de miel dans des colonies de *V. velutina* (invasif dans cette région du globe depuis presque dix ans (Choi *et al.* 2012)) aient été observés (Choi, Workshop Coloss Mallorca, 2017, pers com), mais en Europe ce phénomène n'a pas encore été rapporté. En général les sites de collecte de nourriture sont partagés chez les *Vespinae*, mais pas ceux de collecte d'eau ou de fibres de bois (Greene 1991). Cependant chez *V. velutina*, un partage de site de collecte de fibres de bois par des ouvrières a été observé (A. Manon, apicultrice, 2016, pers com).

Les preuves de marquage du site de collecte de nourriture sont donc très minces, et non reproductibles, chez d'autres espèces que *V. mandarinia* (Jeanne & Taylor 2009). Mais cette dernière espèce de frelon

a besoin d'agir en coopération pour percer les défenses des colonies d'abeilles, de guêpes et de frelons dont il se nourrit. Pour les autres guêpes sociales décrites jusqu'à présent, la nature des proies n'entraîne pas la nécessité d'une telle coopération, et le bénéfice d'un tel marquage pourrait être trop faible. Pour l'instant aucun marquage des ruches n'a pu être mis en évidence suite à des chasses fructueuses par *V. velutina*. **Cependant *V. velutina* a lui aussi tendance à particulièrement attaquer en groupe des colonies d'abeilles soit en ruches (Tan et al. 2007, Monceau et al. 2013b), soit lorsque la colonie d'abeille essaime (D. Thiéry pers obs.). Aucune forme de coopération lors de la chasse sur les ruchers n'a encore put être mise clairement en évidence, mais peut-être est-ce une forme intermédiaire de facilitation sociale ?**

B.1.1.2 Polyéthisme et spécialisation

Le polyéthisme est une des caractéristiques des animaux sociaux, il définit la **division du travail** (Gordon 2010). Cette organisation dépend de l'**espèce**, de différents paramètres individuels **physiques** (taille), **physiologiques** (âge, caste), de paramètres **coloniaux** (âge de la colonie, besoins) ou **climatiques** (température, luminosité, humidité) (Jeanne & Taylor 2009). Chez les espèces de *Vespidae* faisant des petites colonies, les ouvrières ont généralement une grande flexibilité comportementale, contrairement à celles des espèces à grandes colonies, qui ont généralement un large spectre d'exploration et d'exploitation de leur environnement et sont plus spécialisées (Gautrais et al. 2002, Perveen & Shah 2013). *Vespa velutina* faisant des colonies de tailles importantes comparées à celles d'autres frelons (Matsura & Yamane 1990), nous pourrions donc supposer une plus forte probabilité de spécialisation de ses ouvrières.

Chez les *Vespidae*, les ouvrières commencent leur vie adulte en assurant le soin au couvain et à la reine, l'entretien du nid, puis elles vont se consacrer aux tâches risquées externes au nid. Elles commenceront donc par collecter les matériaux de construction pour le nid (fibres de bois et substances végétales, eau), travailler à la maintenance extérieure du nid (réparation des trous, imperméabilisation) avant d'évoluer vers de la collecte de carbohydrates, et enfin de proies ; les ouvrières âgées se concentrant au final sur la collecte d'eau (Potter 1964, Akre et al. 1976). Cependant, même après avoir démarré la collecte de denrées, les ouvrières n'abandonnent pas les

travaux au nid : la spécialisation chez les *Vespidae* semble donc être assez rudimentaire en comparaison d'autres insectes sociaux. Chez les *Polistes* sp., par exemple, le taux de collecte est étroitement corrélé au nombre de larves dans la colonie, ce qui suggère que cette activité soit majoritairement **dirigée par la demande de la colonie**, en plus de l'offre (West-Eberhard 1969, Howard & Jeanne 2005). Une demande grandissante ou imprévue de matériel de construction, par exemple en cas de destruction d'une partie du nid, ne fait pas changer de rôle les collectrices de nourriture ou augmenter la cadence de collecte des collectrices de matériaux chez *P. occidentalis* ; dans ce cas, les ouvrières passent juste plus tôt du rôle de nourrices à celui de collectrices de matériaux (O'Donnell & Jeanne 1992a). De la même manière, chez *Polistes instabilis*, le retrait d'un groupe de collectrices de nectar prend quelques jours à être compensé par la colonie, non pas en augmentant la cadence de collecte des collectrices de nectar existantes, mais en les remplaçant par des ouvrières recrutées parmi les ouvrières collectrices de matériaux ou nourrices (O'Donnell 1999). Ces auteurs observèrent ainsi une augmentation d'interactions dominantes durant cette période, ce qui suggérerait également un rôle de la dominance dans la régulation de la collecte de nectar.

De plus, la **structure de la colonie** va influencer sur ses besoins, et donc fait varier le polyéthisme: chez certaines guêpes polistes par exemple, les premières cohortes d'ouvrières vont devenir collectrices beaucoup plus tôt dans leur vie que les ouvrières émergeant plus tardivement, qui resteront sur des travaux au nid bien plus longtemps (West-Eberhard 1969, Dew & Michener 1981, Post *et al.* 1988). Chez d'autres espèces comme *Polybia occidentalis* (O'Donnell & Jeanne 1990), *Metapolybia* spp. et *Protopolybia exigua* (Simões 1977, Forsyth 1978, Karsai & Wenzel 2000) il existe à la fois un polyéthisme très fort lié à l'âge, mais également à l'échelle des individus, qui développent une très forte tendance à se spécialiser pour une ou deux des quatre ressources collectées en groupes fonctionnels: proies ou nectar (nourriture), ou pulpes de bois et eau (matériaux pour le nid). Les colonies de *V. vulgaris* (Potter 1964, Roland 1976) et *P. occidentalis* (Jeanne, unpublished data) favorisent, quant à elles, la collecte de pulpe de bois et la construction du nid tôt le matin, l'humidité le rendant sûrement plus malléables. Au contraire la collecte de proies et de carbohydrates a tendance à se répartir plutôt dans les périodes les plus éclairées (Archer 2004). Volynchik *et al.* 2008 ont pu

corrélent l'activité de vol de *V. orientalis* avec les radiations en UVB, la température et l'humidité relative, puis [Plotkin et al. 2010](#) ont su rattacher ce potentiel d'activité à une emmagasination d'énergie par ces frelons *via* leur cuticule. Il semble donc logique dans ce cas que les activités demandant le plus d'énergie, comme la chasse, soient réalisées lors des périodes les plus éclairées.

D'un point de vue évolutif, [Jeanne & Taylor 2009](#) ont posé l'hypothèse que les stratégies de collecte de ressource chez les *Vespidae* sont optimales pour répondre à au moins trois compromis : (1) la **quantité d'effort** consacré à la collecte ou à d'autres activités (construction du nid, soin au couvain, défense), (2) **la division des efforts** entre la collecte de **ressources alimentaires et de construction**, et (3) **l'allocation des efforts** des collectrices entre la **chasse et la collecte de carbohydrates**.

B.1.1.3 Sources de nourriture de *V. velutina*

Vespa velutina est un insecte généraliste, comme la plupart des *Vespidae* ([Figure 19 A, B, C, D](#)) ([Spradbery 1973](#)). Les imagos (ouvrières, reines et mâles) collectent des ressources dans des zones naturelles (carbohydrates - sève, fruits, miel, nectar² ; protéines - insectes, cadavres) ou dans des endroits plus ou moins urbanisés (carbohydrates : confitures, sirops et autres produits sucrés ; protéines (poubelles, étals de marchés, zones d'affrètement de marchandises, pêcheries et production ostréicoles ([Monceau & Thiéry 2017](#))). Les proies sont prémâchées en boulettes pour nourrir les larves ([Figure 19.B](#)).

² Les adultes de *V. velutina* peuvent être observés butinant sur différentes fleurs, comme celles entre autres du lierre, du bananier, du camélia et du cerisier.

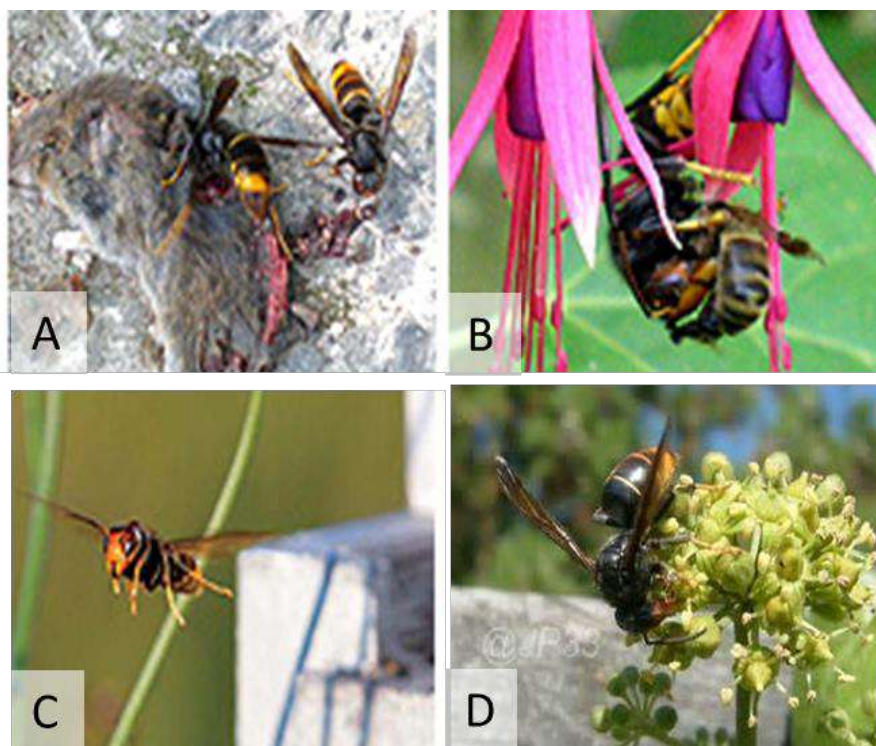


Figure 19 : A : Ouvrières de *Vespa velutina* se nourrissant de viande sur une musaraigne morte, B : ouvrière de *V. velutina* découpant une abeille pour ne garder que le thorax et le donner, une fois mâché, aux larves de sa colonie, C : ouvrière de *V. velutina* en vol stationnaire devant une ruche pour y chasser des abeilles, D : *V. velutina* se nourrissant de pollen de lierre. (Photos : A, B, C Karine Monceau, D : Jean-Paul Cros).

B.1.1.4 Tester le degré de spécialisation des ouvrières de *V. velutina*

Cette expérimentation fera éventuellement l'objet d'une soumission pour publication sous forme de courte note. Elle est donc présentée sous la forme de sa rédaction actuelle en Annexe 2.1.

Résumé

Les ouvrières chasseuses de *V. velutina* capturées devant les ruches sont attirées en laboratoire par les odeurs de la ruche (phéromones de reine ou d'agrégation d'abeille, cire, pollen) (Couto *et al.* 2014). Se pose donc alors la question de la spécialisation des ouvrières de frelon pour un type particulier de ressource : les *V. velutina* chasseuses d'abeilles sont-elles spécialisées dans la chasse d'abeilles sociales ou non sociales ? D'autres ouvrières capturées lors de la collecte d'autres denrées seraient-elles aussi attirées par les abeilles ? Comme cela a été dit précédemment, les ouvrières de *V.*

velutina collectent de nombreuses denrées glucidiques et protéiques. Afin de différencier une spécialisation d'un opportunisme dans la collecte de nourriture chez *V. velutina*, nous avons donc capturé dans cette expérimentation des ouvrières de frelon venant s'approvisionner sur divers appâts. Elles ont alors été soumises à un test de choix en laboratoire, afin de mesurer leur attirance pour différents items rappelant les sources de nourriture sur lesquelles elles avaient été capturées. Ainsi, 86 ouvrières de *V. velutina* ont été collectées sur 3 types de ressources de nourriture : des ressources glucidiques végétales (fleurs, fruits) ; des ressources protéiques type carcasses (poissons, crevettes, viandes) ; et des ressources de type ruche (abeilles, cire, miel). Elles ont alors été soumises à un test de choix en laboratoire, dans des conditions similaires à celles de [Couto et al. 2014](#), où différents items contenant des éléments des trois différentes sources et un témoin leur ont été proposés. Le temps passé sur chaque item par individu et le nombre de visites par item et par individu ont alors été analysés après un enregistrement vidéo.

Nous n'avons pas pu avoir suffisamment d'individus pour valider statistiquement les résultats de cette expérimentation pour les ressources poisson/crevette. De manière générale, nous observons que les ouvrières de *V. velutina* ont à la fois visité plus de fois et sont restées plus longtemps sur les ressources glucidiques végétales, ici fleurs, fruits et nectar, et un peu sur les ressources de la ruche. Nous ne pouvons pas différencier ici un comportement de collecte d'un ravitaillement, les glucides étant le carburant de base des adultes. De plus, des différences liées à la nature des appâts utilisés pour la capture des individus (site, manipulation) pourraient avoir impacté nos résultats. Pour conclure, nous proposons un protocole différent pour continuer ces investigations, qui se servirait des technologies RFID afin de suivre le comportement de collecte des individus tout au long de leur vie, avec des portails électroniques placés au nid et à l'entrée de différents nourrisseurs à l'extérieur ([Pour plus de détails sur ce projet, voir la Discussion générale de cette thèse](#)).

B.1.2 Nutrition de la colonie

Le transfert de nourriture entre les ouvrières et leurs jeunes est un élément central dans la vie de la colonie (Montagner 1963, Le Masne 1980), et a été étudié très tôt chez certains insectes sociaux comme les fourmis (Deby & Tschinkel 1986, Bonavita-Cougourdan & Passera 1978, Markin 1970, Cassill & Tschinkel 1995), les abeilles (Pershad 1967), chez certaines guêpes (chez *Polistes* par Pardi 1950, Morimoto 1960, Montagner 1963), et même chez un frelon (*V. orientalis* par Ishay & Ikan 1968). Il a été mis en évidence un fort effet de la **température**, du **type de nourriture** et de la **taille de la colonie** sur le nombre d'individus nourris par des ouvrières.

Rappelons ici que chez les *Vespidae*, contrairement aux abeilles, les larves ne baignent pas dans des réserves nutritives, et doivent donc être **régulièrement approvisionnées** de petites boulettes de nourriture et entretenues par les ouvrières. Le flux de nourrissage des larves est très important, par exemple chez *Ropalidia marginata*, une larve est nourrie en moyenne 0.21 ± 0.17 fois par heure (Gadakar & Joshi 1983). Chez les guêpes sociales les larves sont nourries proportionnellement à leur poids, les plus grosses recevant plus de nourriture (Montagner 1963). Lorsque l'automne arrive, des cellules plus grandes sont construites, dans lesquelles les futures reines seront produites : elles seront d'avantage nourries que les autres larves (Makino & Yamane 1997). La vitesse de développement des larves de frelon *V. affinis* dépend du nombre de larves dans la colonie, avec les premières générations qui se développent plus vite (Martin 1992).

Les **régurgitas** que produisent les larves lorsqu'elles sont stimulées par les adultes, le plus souvent avant nutrition, ont une composition très riche en sucres et en acides aminés (Maschwitz 1965, Takashi *et al.* 1991), et contiennent des enzymes sans lesquelles les adultes seraient incapables de digérer certaines protéines (Ishay & Ikan 1967). Les enzymes en question sont des endopeptidases proches de trypsines (chez *V. orientalis* et *V. crabro*, Jany *et al.* 1978). Cette récompense inciterait les adultes à nourrir plus abondamment les larves produisant ces récompenses. En 1968, Ishay & Ikan ont démontré l'incapacité des reines de *V. orientalis* de survivre sans couvain, à partir du moment où elles sont entrées dans une phase de ponte très importante : la quantité d'énergie nécessaire pour maintenir

le rythme de ponte serait trop forte sans l'apport énergétique permis par la consommation par la reine de régurgitas larvaires.

Vespula squamosal, *V. germanica* et *V. vulgaris* peuvent partager leurs proies au nid avec leurs consœurs, parfois systématiquement s'il s'agit de nourriture de type carbohydrate (Jeanne 1991). Mais ce partage peut évoluer avec la taille de la colonie, par exemple chez *V. pensylvanica* et *V. atropilosa*, c'est seulement dans le cas de vieilles colonies que les ressources en carbohydrates seront complètement réparties (Akre et al. 1976).

L'objectif de l'étude présentée ci-après est d'analyser les transferts de nourriture entre une ouvrière et le reste de la colonie suivant sa structure. Nous avons donc sélectionné deux types de nourriture, glucidique (de l'eau sucrée), et protéique (jus de mouche), que nous avons fait distribuer par deux ouvrières en 24h à 23°C dans des colonies de différentes structures (ratio mâles / larves / ouvrières / reines variable). L'objectif étant de mieux comprendre comment une potentielle substance perturbatrice pourrait être distribuée suivant le type de vecteur choisi, la taille et la structure de la colonie.

Nous avons pour cela utilisé des marquages par éléments traces (métaux lourds non radioactifs), et en particulier deux éléments (Césium et Rubidium) permettant de marquer deux types différents de nourriture.

Manuscrit 3: Studying food distribution in *Vespa velutina* nests using heavy metal tracers.

Juliette Poidatz, Olivier Bonnard, Denis Thiéry

*Manuscrit en cours de préparation, pour soumission potentielle dans **Animal Behaviour**.*

Abstract

Vespa velutina is an invasive hornet predator of bees which has dramatically expanded across Europe. Studying the food distribution by *V. velutina* workers among nestmates will guide future colony disruption control methods. Protein and sucrose solutions were labelled with non-radioactive heavy metals, rubidium and caesium, respectively. How individual workers, returning to their nests with labelled food, distributed this food amongst colony members was measured 24 hours later using ICP-M analysis. This was repeated for each of seven wild colonies, differing in size and structure. Caesium labelled sucrose was preferentially distributed to adults (workers, males and the queen), while rubidium labelled proteins were distributed more to larvae. Considering all individuals, the lightest larvae received labelled proteins more often. A small proportion of larvae also received sucrose, but in those the quantity of received food was inversely correlated with larval weight. Amongst workers that received labelled food, the quantity of received sugar was also inversely correlated with worker weight, while the quantity of received proteins increased with worker weight. The number of fed larvae and workers was not correlated with the total number of workers and larvae in the colony. Males only received food when there were no larvae in the colony.

These results improve our knowledge of hornet biology, and especially this methodology will prove itself useful in determining the amount of food entering a nest and the number of larvae fed by a single worker.

Keywords: colony, rubidium, caesium, yellow legged hornet, social insect

Highlights

- A description of food distribution inside a hornet nest using heavy metal labelling is presented.
- Labelled sugar was distributed preferentially to adults, while labelled protein was distributed more to eggs and larvae.
- The number of fed individuals with labelled sugar increased with the total number of larvae in each of the colonies, while the number of larvae fed with labelled protein increased the total number of individuals in the colony.
- Considering all individuals, the lightest larvae received labelled protein more often.
- Amongst larvae that received labelled sugar, the quantity of received food was inversely correlated with larval weight.
- Amongst workers that received labelled food, the quantity of received sugar was inversely correlated with worker weight, while the quantity of received protein increased with worker weight.

Introduction

In social insects, the nest is the central place in which the brood is located and in which most of the interactions between individuals occur (Oster & Wilson 1978, Theralauz *et al.* 1998, Pacala *et al.* 1996; Gordon 1996). Inside the colony, food is thus transferred by trophallaxis between adults and larvae and between adults (workers, males and queen) (e.g. in *V. orientalis* in Montagner 1963 and Ishay & Ikan 1968). The magnitude of these exchanges depends on the type of food, the colony size, the temperature, the amount of food entering the nest per unit of time and the hunger level of the colony (for ants : Cassill & Tschinkel 1995, Markin 1970 ; for bees : Galiot & Azoeuf 1979, Galiot *et al.* 1982, Nixon & Ribbands 1952, Pershad 1967 and for wasps : Montagner 1963). For example, Markin showed in 1970 that workers of the wasp *Tridomyrex humilis*, distributed sugar to 90% of the colony workers in a hungry colony, this proportion decreasing to 30% of colony workers in a well fed colony. While for protein, the opposite was found.

Compared to other social hymenoptera, vespids have one characteristic: Larvae are fed with proteins while adults feed mostly on sugars or sugar derivatives (fruits, honeydew produced by aphids...), occasionally on proteinaceous juices coming from the prey they had chewed for the larvae (Montagner 1964, Spradberry 1973, Edwards 1980, Raveret Richter 2000). Thus workers are mainly hunters which invest most of their foraging time in collecting protein for the larvae, and the rest of the time in collecting other resources for colony maintenance (sucrose food, water, nest materials) (Cane 1983, Matsuura & Yamane 1990, Raveret Richter 2000). When fed, larvae produce saliva drops rich in amino acids, to attract and reward their food provider (Hunt *et al.* 1982, Maschwitz 1965, Takashi *et al.* 1991). These secretions are very important for colonial cohesion, as they contain constituents essential for adult protein digestion (Ishay & Ikan 1967, Jany *et al.* 1978), and queen nutrition (Ishay & Ikan 1968). Males seem to be only receivers of food in the colony (Montagner 1963).

The development cycle of vespid colonies can be summarized as follows, and implies changes in the colony structure, i.e. its composition in term of castes and stages present : (1) **initiation period**: a foundress (or a few, given the species) initiates the building of a nest in which she raises the first cohort of workers ; (2) **growing phase**: the foundress stops foraging, letting the workers do this job

while she stays in the nest laying eggs, reusing cells several times for egg-laying for this purpose; (3) **reproductive phase**: the foundress concentrates her egg laying in the bigger bottom combs and starts producing reproductive (males, gynes); (4) **decline phase** : reproductives emerge, stay a while in the nest monopolizing the workers to be fed, and then mate before or after leaving the nest; in temperate climates, only the gynes survive hibernation, the rest of the colony declines (Matsuura & Yamane 1990).

Vespa velutina var. *nigrithorax* is a hornet from East China (Arca et al. 2015) accidentally introduced in France in 2004 and currently expanding across Europe (see Monceau et al. 2014 and Monceau & Thiéry 2017 for a review). *Vespa velutina* is, as other hornets, a monogenic species. It builds very prolific colonies, producing 15 000 individuals per year (Rome et al. 2015). The nests of *V. velutina* are made of paper, with one unique small entrance hole in the external envelope, located at the bottom of the nest in the early nest stages, and later on its side. Its shape is first round, but then expands mostly at the bottom, taking on an “egg” shape. Nests of *V. velutina* are mostly located in open areas, amongst trees, bushes, and more rarely in cavities in the ground, or in buildings etc... (Monceau et al. 2014a). *V. velutina* is a generalist predator of arthropods (dipteran, lepidopteran and other apidae) and a scavenger (Monceau et al. 2014a). Its workers predate on honeybees in huge amounts in front of their hives from July to November (Matsuura 1988, Tan et al. 2012, Monceau et al. 2013b). The invasion of *V. velutina* in Europe is thus a direct threat to the global local biodiversity (Monceau & Thiéry 2017).

Currently no efficient control practice can be applied against *V. velutina*, except its nest destruction, which is time consuming and rather expensive (Monceau et al. 2014a). Studying the food distribution among the colony members of *V. velutina* could thus allow further application, for example in helping develop Trojan Horse strategies, which consists of offering foragers food as bait, contaminated with either biological control agents (e.g. entomopathogenic fungi, biological toxins, or parasites (Naug & Camazine 2001)), or insecticidal agents (e.g. growth regulators, chitin synthesis inhibitors...), though such strategies would have to be first checked for the absence of unacceptable side effects to the

environment. Such a strategy was proposed against the invasive *Vespula germanica* in New Zealand, and to date is the only effective one (Beggs et al. 2011).

In the present work, we analysed how workers distributed the food they gathered amongst their colony members, utilising different colonies of variable size and structure, by using two types of non-radioactive food labelling: rubidium (Rb) for proteins and caesium (Cs) for sugars. These two elements are very stable which ensure their reliability over time for marking. Rubidium is classically used for labelling insects, and has the advantage of being metabolized in place of potassium. It was for example used for studying several phytophagous pests (Berry et al. 1972), impact natural enemies in biological control programmes (Cohen 1989), movement of insect communities in the field (Long et al. 1998, Prasifka et al. 2001), and amongst trophic webs constitution (Stimman 1974).

The present study had two objectives: 1- Describe how fed sugars and proteins were distributed inside the colony; and 2- Evaluate if this pattern of food distribution varied according to colony structure. To answer these questions, the distribution of rare elements, Rb and Cs, was analysed 24 hours after a worker returned with liquid labelled food, amongst seven wild *V. velutina* colonies of different size, under controlled conditions.

Material and methods

- *Baseline measurement of the natural Rb and Cs levels inside V. velutina*

To determine a baseline (i.e. average amount of Rb and Cs in individual hornets), we analysed 10 larvae, 5 pupae and 10 adults of *V. velutina* from one colony collected in the wild in Bordeaux (C1), and 10 adults from another C2 collected immediately before the marking experiments.

- *Collection of colonies & maintenance for the marking experiments*

Seven wild colonies of *V. velutina* were collected in the field; the characteristics of the tested colonies and their origins are provided in table 1. Nests were collected early in the morning (between 5 and 8

am), and we captured as many workers defending the nest as possible with an entomological net. Nests were brought to the laboratory, and after a cooling period of 24h at 4°C, the nests were hung in a cage, using metal strings, placed inside a climatic room (23±1°C, LD 12/12). The cage was made of a mahogany frame, metal mesh and Plexiglas sides, equipped with two secured apertures and one secured coppered sliding plate, for food and water supply as described earlier (Monceau *et al.* 2013a, Couto *et al.* 2014, Poidatz *et al.* 2017). Via a drawer, hornets had *ad libitum* access to water, honey, fruit syrup and cat food. The nest was kept for at least one week under observation before conducting the tests, always under the same conditions, to be sure that the colony was active and not anarchic. To avoid the degeneration of captive colonies due to overpopulation in a confined space, we artificially removed some of the workers of populous colonies during their adaptation week (nest 2: 35 workers, nest 5: 40 workers). We intentionally collected “small” *V. velutina* colonies, the cage dimensions not being adapted to house massive nests (Monceau *et al.* 2013). In nest 7, one of the two control individuals that were released into the colony was missing when we collected the individuals, possibly due to cannibalism.

As mentioned in the introduction, the production of different castes changes with the season in *V. velutina* colonies, which explains the differences in the colony structure of the different wild colonies observed here. For example, nest 1 was at the beginning of its cycle (“initiation period”), with all the cells being full with larvae or eggs, while nest 7 was at the end of its cycle (“decline period”), with no larvae or eggs left in the cells, and males waiting for their nuptial flight.

- *Preparation of the labelled solutions*

Two feeding solutions were made, one with proteins and the other with sucrose, respectively labelled with rubidium (Rb) and caesium (Cs).

- **Protein labelled solution:** 1ml of 521 rubidium solution ([Rb]= 10g/L RbNO₃, (Rb from rubidium ICP standard, RbNO₃ in HNO₃ 2-3%, Certipur®, 1000mg/L Rb, Merck, Darmstadt, Germany)) + 1ml of fly solution. The fly solution was made by crushing flies (Blue bottle fly,

Calliphora vomitoria) for 10 minutes in a ball mills (TissueLyser II, Qiagen) in water, and then filtering the mix. All tests used the same initial protein solution, which was aliquoted in several Eppendorf tubes conserved in the freezer.

- **Sugar labelled solution:** 1ml of 438 caesium solution ([Cs]= 10g/L CsCl, (Cs from caesium ICP standard, CsNO₃ in HNO₃ 0.5mol/L, Certipur®, 1000mg/L Cs, Merck, Darmstadt, Germany)) + 1ml of dissolved sugar in water ([sugar]=30g/L).

- *Experimental design*

After the colony observation period, at 10:00 pm on day 0, we selected 4 workers in the foraging drawer, later called “positive controls”, labelled them on the thorax using a paint pen (DECOpainter, Marabu), and put them in pairs in two aerated plastic boxes (10x10x10cm) without water or food for 4 hours (Figure 1). At 14:00, one 3cm diameter Petri dish containing either of the labelled solutions described before was introduced in each box. The positive controls fed for 2 hours in their respective boxes (Figure 1), then at 16:00 we froze one of each pair (-20°C, positive controls), and released the two remaining workers in the cage containing the colony (Figure 1). We let the positive controls transfer food to the colony for 24h, before we then froze the nest (-20°C). A picture of the nest combs was taken, and each larval coordinates was referenced and localized in the combs. All individuals of all stages (except pupae, which could not have been fed by the control because of their cocoon), were put in labelled Eppendorf tubes. Eggs and first stage larvae, being too slight and small for the analysis, were pooled in groups of 10 to 15 eggs/larvae.

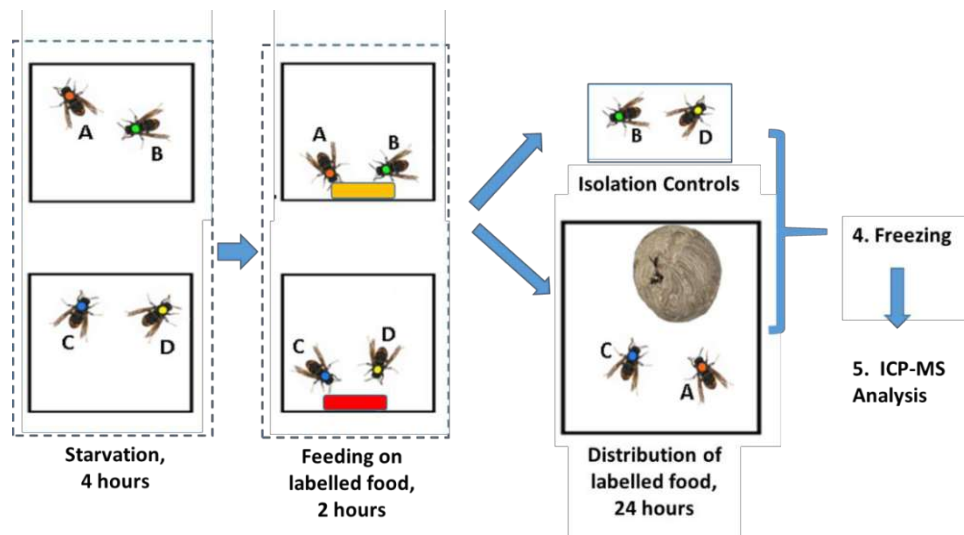


Figure 1: Experimental principle. From left to right: Positive control workers starved for 4 hours, then fed on labelled food for 2 hours, before one of each box is released at its nest while the other two are directly frozen. The whole colony is frozen 24h after. Then ICP-MS analysis took place.

- *Rubidium and caesium analysis*

The samples were weighed using an electronic high precision balance (Radwag AS110/X, $e=1$ mg, $d=0.1$ mg, [110-10 mg]), transferred in a silicone capsule, dried in a heat chamber (Memmert) at 103°C for 12 hours, then cooked in a muffle oven (Thermolyne) at 480°C for 5 hours. Samples were then solubilized in 2.5 ml citric acid (Baker Analyzed, 65% HNO_3) placed on a heating plate regulated at 120°C . After evaporation, 2.5 ml of miliQwater was added, and after evaporation, 5 ml of citric acid at 32.5% HNO_3 was added. The solution was then rinsed with hot miliQ water. Once the solution was cool, the analysis with an ICP-MS took place (Agilent technologies, 7700 series, plasma power: 1.55 KW, room temperature: 2°C), equipped with a canister (Micromist, 1.03L/min gaz). For the ICP-MS calibration, we used solutions of Rb and Cs at five concentrations in HNO_3 (5%) being 0,15,30, 60, 120 ppb for the Rb (rubidium ICP standard, RbNO_3 in HNO_3 2-3%, Certipur®, 1000 mg/L Rb, Merck, Darmstadt, Germany); and 0,7.5, 15, 30, 60 ppb for the Cs (caesium ICP standard, CsNO_3 in HNO_3 0.5 mol/L, Certipur®, 1000 mg/L Cs, Merck, Darmstadt, Germany).

Positive controls that received labelled food from the other positive control were considered as other workers in the analysis.

1 *Table 1: Date of test, origin and structure of the studied colonies. T=control labelled workers*

	<i>Nest 1</i>	<i>Nest 2</i>	<i>Nest 3</i>	<i>Nest 4</i>	<i>Nest 5</i>	<i>Nest 6</i>	<i>Nest 7</i>
<i>Date of collection</i>	28/06/15	21/07/15	12/08/15	25/11/15	15/06/16	21/06/16	12/11/16
<i>Date of test</i>	15/07/15	06/08/15	12/08/15	02/12/15	27/06/16	27/07/16	21/11/16
<i>Origin of the nest</i>	le Haillan	Les Salles de Carrignan	Bordeaux	Artigues	Pessac	le Haillan	St Medard en Jalles
<i>GPS</i>	44°52'28.2"N 0°40'47.7"W	44°48'23.4"N 0°27'52.7"W	44°48'59.9"N 0°34'08.4"W	44°51'46.4"N 0°28'39.5"W	44°47'58.0"N 0°37'35.6"W	44°51'50.1"N 0°40'37.2"W	44°52'45.8"N 0°42'21.8"W
<i>Workers</i>	15+4T	67+4T	41+4T	7+4T	59+4T	46+4T	29+3T
<i>Males</i>	0	0	0	30	0	0	49
<i>Queen</i>	1	0	1	0	1	1	5
<i>Larvae</i>	5	24	82	30	54	17	0
<i>Eggs</i>	1 group	0	7 groups	0	7 groups	6 groups	0

Axe 2

- *Statistical analysis*

All statistics were made using the statistical software R3.2.2. Results are presented as the means $\pm$ SD. A Shapiro test was used to assess the normality of the data. For comparing categories, a Student's t-test was used when the data were normally distributed; otherwise, the Kruskal–Wallis test was used. To examine the correlation between different parameters, we used the Pearson correlation test if the arguments were normally distributed, otherwise the Spearman rank correlation test.

The ICP-MS technique allows to accurately assess the concentration of Cs and Rb ($\mu\text{g/kg}$) (Berg *et al.* 1995, Vogl & Heumann 1997). To correct their level reading, we had to assess the background value for each element: for Rb=16 $\mu\text{g/g}$, and for Cs=2 $\mu\text{g/g}$. For nest 5, the background level was much higher at Rb=50 $\mu\text{g/g}$. An individual was considered as having received food when its Cs or Rb level was above the baseline levels described above. For the presentation of the results, we ranked the nests given their position in the development cycle of *V. velutina*: N1; N6; N2; N5; N3; N4 and N7.

Results

- *Rare element base levels in different *V. velutina* stages*

The basal levels of Rb and Cs in the different *V. velutina* stages are presented in table 2. The larvae tested here were final stage larvae that weighed more than 200 mg.

Table 2: Quantities of rubidium (RB) and caesium (CS) in hornets as mean $\pm$ SD [min – max] per kg of fresh body weight.

	CS ($\mu\text{G/KG}$)	RB ($\mu\text{G/KG}$)
LARVAE (N=10)	41.9 $\pm$ 19.6 [20 – 90]	7455 $\pm$ 1224.8 [5590 – 9130]
NYMPHAE (N=5)	50 $\pm$ 7.1 [40 – 60]	8220 $\pm$ 713.1 [7240 – 9000]
ADULTS (N=10)	780.1 $\pm$ 586.1 [357-2000]	8254.4 $\pm$ 3626.5 [3690 – 15600]

Axe 2

- *Food distribution inside V. velutina colonies*

- *Evolution of the number of labelled individuals with colony structure*

We first looked at the number of workers and larvae receiving protein solution or sugar solution relative to the total number of workers, larvae or all individuals in the colonies. We found no correlations between the number of workers that received proteins (labelled by Rb) or sugar (labelled by Cs) and the number of larvae, workers or total individuals in the colonies (spearman tests, $p > 0.05$). On the other hand, the number of fed larvae with labelled sugar was correlated with the total number of larvae in the colonies (Spearman correlation test, $p = 0.035$), and the number of larvae fed with labelled proteins was correlated with the total number of individuals in the colony (all castes without eggs, Spearman correlation test, $p = 0.037$).

There was no differences in the weight of workers receiving labelled food (t.test, for sugar: $p = 0.09$, for proteins: $p = 0.35$, $N = 260$); the same for sugar in larvae (t.test, $p = 0.85$, $N = 223$). But labelled proteins were distributed to the lightest larvae in the colony (t.test, $p = 0.003$, $N = 223$).

The evolution of colony structure and marked individuals by the labelled food is represented in [Figure 2](#).

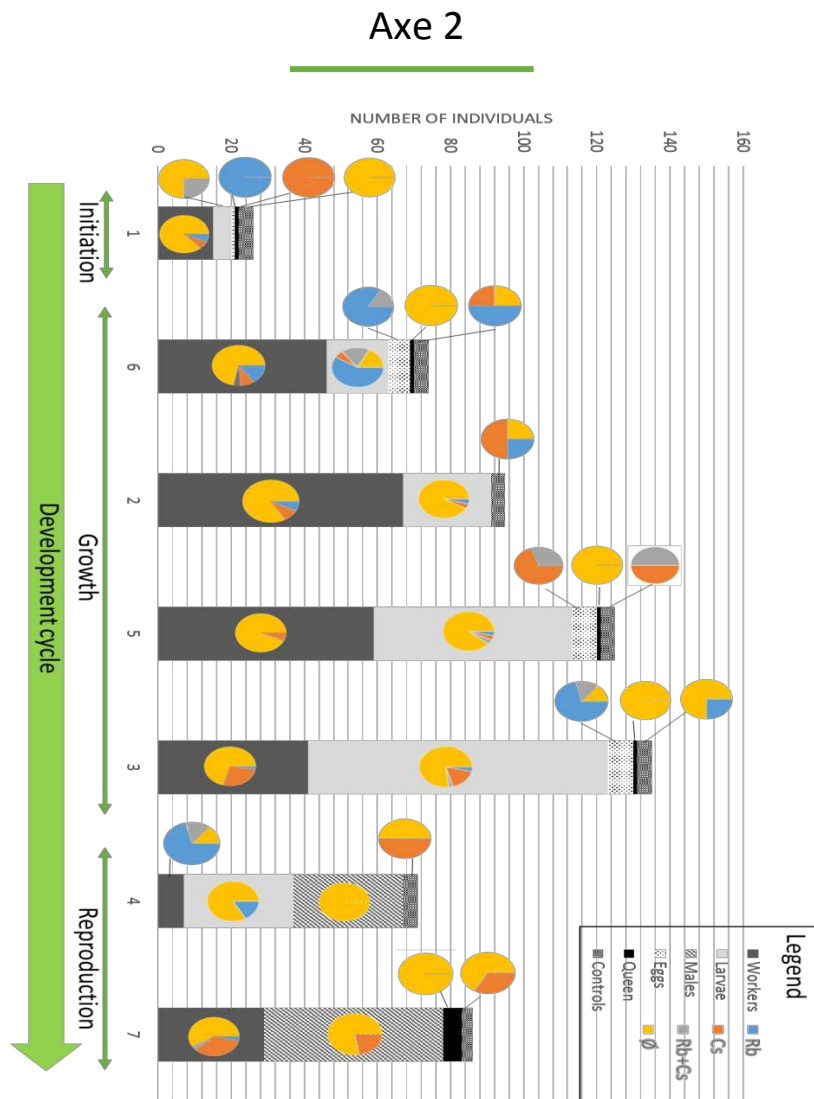


Figure 2: Number of individuals marked by received labelled food as a function of colony structure (Rb: protein solution labelled with rubidium, Cs: sugar solution labelled with caesium).

Each positive control worker, released in its nest, distributed food to a very variable number of individuals (considering all confounded castes, but without eggs), with a mean $\pm$ standard deviation [range] of 7.85 ± 6.71 [2-21] individuals for labelled proteins, and 11 ± 9.73 [2-27] individuals for labelled sugar.

➤ *Number of Rb/Cs labelled individuals amongst each category of labelled individuals*

Larvae were more often receiving proteins (Rb label,) than sugar (Cs label, stats), when **workers** received more sugar (stats) than proteins (stats) (Figure 3). Considering queens and males, there was

Axe 2

only one case for each category where labelled sugar solution was received by one and 16 individuals respectively.

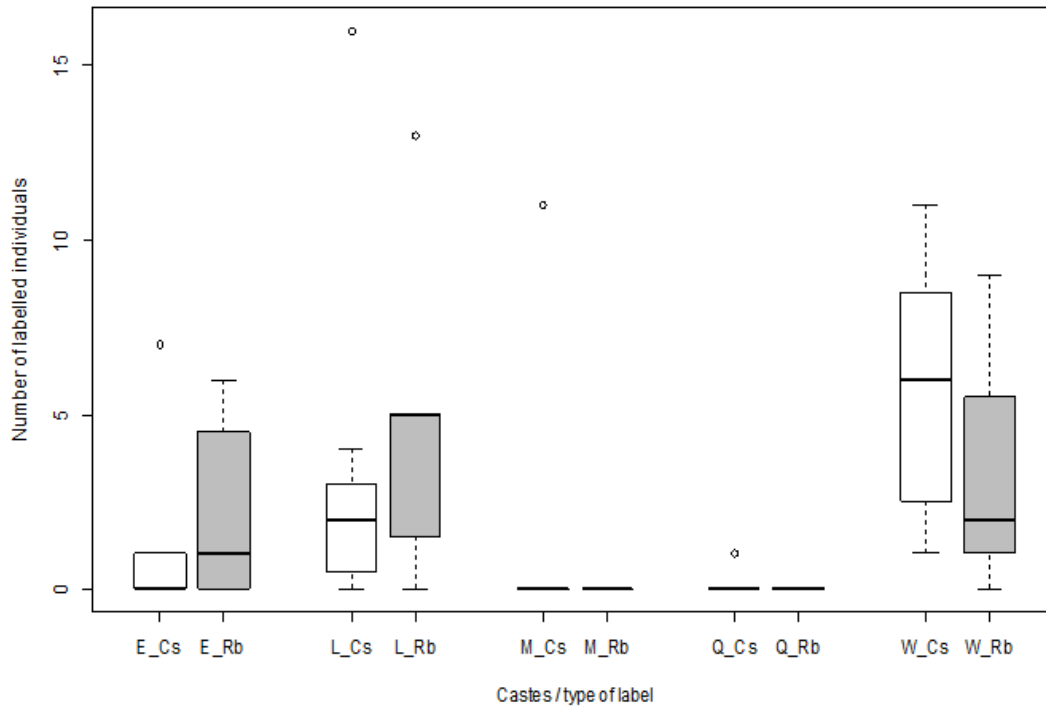


Figure 3: Boxplot of the number of individuals within each caste labelled with caesium (Cs, sugar, White) and rubidium (Rb, proteins, gray). E = Eggs, L = Larvae, M = Males, Q = Queens, W = Workers.

➤ Quantitative analysis of the amount of labelled food received by individuals

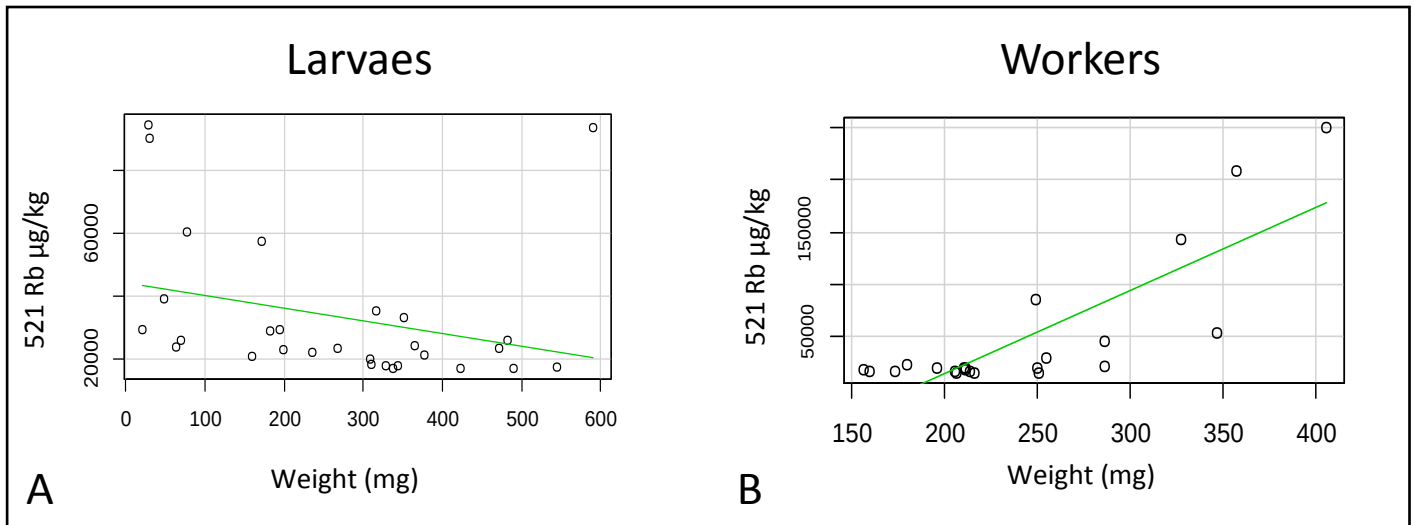


Figure 4 : Evolution of the quantity of rubidium (Rb) received by the Larvae (A) and the workers (B) as a function of their weight.

Considering all larvae that received labelled Cs sugar solution, no correlations could be found between larval weight and their amount of received sugar (Pearson test, $p=0.92$, $N=25$). On the other hand, considering all larvae that received labelled Rb protein solution, the amount of received protein decreased as larval weight increased (Spearman test, $p=0.007$, $\rho=0.48$, $N=29$) (Figure 4A). Considering all the workers that received Cs labelled sugar, no correlations could be found between their weight and their amount of received sugar (Spearman test, $p=0.82$, $\rho=0.64$, $N=34$). Considering all the workers that received Rb labelled proteins, the amount of received proteins increased as worker weight (Spearman test, $p=0.029$, $\rho=-0.37$, $N=22$) (Figure 4 B).

Discussion

This study describes how workers distribute the food resources they gathered amongst their nestmates (larvae and adults) with special focus to proteins and sugar.

Axe 2

The Rb average background level observed in our *V. velutina* colonies was quite similar as the one observed in the study of [Weeks et al. 2004](#) on ants, except for colony 5, which had a higher level.

The number of labelled individuals varied with the *V. velutina* colony structure, as the number of individuals fed with labelled sugar increased with the total number of larvae in the colonies, and the number of larvae fed with labelled proteins increased with the total number of individuals in the colony. Compared with ants, the number of feeded individuals by one worker seems to be very small both for sugar and proteins (to average 10 other workers in total in hornets, compared with average 100 and 32 workers for sugar and proteins respectively in ants) ([Markin 1970](#)). This may be due to the level of eusociality observed in the studied ant species (*Iridomyrmex humilis*) compared with our hornet.

Eggs and Larvae received proteins (Rb) more often than sugar (Cs), while workers received sugar more often than proteins, as is generally as expected ([Montagner 1963](#)).

In ants, some workers could redistribute part of the food they receive ([Markin 1970](#)), and we cannot thus distinguish labelled individuals that were directly fed by the control forager from the one fed by intermediaries.

- Larvae and eggs

The lightest larvae received labelled food more frequently than the heaviest, which could suggest that workers distribute food in priority to the youngest larvae, weight being connected with age in larvae ([Dubuysson 1903, 1904](#)). On the other hand, [Montagner & Courtois \(1963\)](#) showed in another vespid, *Paravespula germanica*, that the larvae were fed with proteins in proportion of their size, and in their study on *Mischocyttarus drewseni*, [da Silva et al. 2012](#) described that larger larvae received both more nectar and proteins. Such distinction in the results may be due to the studied model species, the experimental design, and studied timeframe. Indeed, these authors compared total cumulated food received by queen and worker larvae, while we focused on the precise distribution

Axe 2

choices of single individuals during a day. Moreover, unlike in wasps, individual weight is probably not a caste criterion in *V. velutina* (Perrard *et al.* 2012).

Some labelled material was found in groups of eggs, and this raises an interesting question. This may be interpreted as due to small amounts of protein deposited as preparatory provisioning for neonate larvae, maybe by licking as in ants (Markin 1970) : this author hypothesized that the licking could be a way to transfer food to the egg. Though we cannot exclude that the high values determined here were due to an overestimate of marker concentration due to the very small weight of eggs (<100mg for the group). The results concerning this stage have thus to be interpreted with caution.

- Workers

In our study we cannot clearly determine the origin of the Rb labelled material found in adults. It could be the result of direct distribution of labelled proteins by the control forager, but could also be due to rewards received from labelled larvae who previously received such proteins from the control forager (Montagner 1963).

The proteins were preferentially distributed to heavier workers, and the quantity of proteins received increased with worker weight, while the quantity of Cs labelled sugar solution received decreased with their weight. In most vespids, the workers size enhances with the colony development, the older workers being thus the smallest. In *Polistes occidentalis*, (O'Donnell & Jeanne 1995) demonstrated that smaller workers, thus being the older, were more likely to be dominant in social interactions between workers (grooming and crop requesting). This was also the case in other *Polistes* sp. (Strassmann & Meyer 1983, Hughes & Strassmann 1988). We can thus hypothesize that concerning workers, the sugar is more “classically” requested between workers during dominance interactions, while we may expect that Rb labelled proteins could come preferentially from indirect sources as larvae that previously received labelled proteins.

Axe 2

- *Males and queens*

Considering queens and males, there was only one case for each category where labelled sugar solution was received by one and 16 individuals, respectively. This is congruent with the literature, knowing that in theory adults only need sugar for their own survival, while they are presumed to consume proteins only occasionally *via* prey remains intended for larvae (Montagner & Courtois 1963). In *Iridomyrmex humilis*, queens have been shown to be preferentially fed with sugar compared with workers (Markin 1970), but in our study it seemed that the new gynes did not received any food in the colony observed (colony 7). The differences can be due both to the methodology in the experiment, that let all the workers in the ant colony access to labelled food instead of one worker, and moreover this author had no males in the observed ant colonies.

In the two colonies in which they were present, males behaved completely different. None were labelled in nest 4 suggesting they had received no food from control foragers, while 16 of them received labelled sugar solution in nest 7. As larvae were absent in nest 7, we could thus hypothesize that the **males are neglected when larvae are in the colony** when sugar is distributed.

The background level of Rb in nest 5 was found to be much higher than in all other nests, which suggests that this nest could have been contaminated by the food present in its surroundings. Biomagnification can occur and for example, rubidium can be found in high and unexpected quantities in seafood like oysters (Campbell *et al.* 2011). This nest was found in a town (Pessac) in the vicinity of different market places that sell such seafood, hence such biomagnification could be hypothesized.

For technical reasons, we artificially regulated colonies' population sizes, and in autumn we worked on smaller colonies than the ones found in the wild (typically housing several thousand individuals (Monceau *et al.* 2014a)). Even if the colony size could have an impact on the way the food was dispatched amongst colony members by workers, as demonstrated by Markin 1970 for ants, we can suppose that food distribution at the scale observed here, i.e. by individual workers, would not differ

Axe 2

much between such colonies. Indeed, in our experiment, the control workers had limited access to labelled food, and had limited distribution capacities.

Even if ensured that the control workers with access to labelled food exhibited similar hunger levels and were already foragers, we cannot assess the quantity of labelled food that each one collected and distributed from its crop. Such quantities could depend for example on their size. In bees, such collection capacity is estimated between 50 and 70 μ L ([Kacelnik et al. 1986](#)) for average 50mg, we could estimate that hornets of average 400mg might have a crop load capacity of 400 μ L. To answer this question, multiple artificial feeders containing small amounts of nectar could be proposed, as done in [Schmid-Hempel et al. 1985](#).

Invasive argentine ants are able to share food between colonies because their “supercolonies” are very close genetically. The method developed here could be a way to explore this behaviour in the invasive hornet *V. velutina*; such effort justified since this hornet is believed to stem from a single invasion event in Europe ([Arca et al. 2015](#)).

Conclusions

In this study we assessed for the first time the impact of colony structure on food distribution in a vespid species, the invasive Yellow-legged hornet *V. velutina*. We isolated global patterns of sugar and protein provisioning according to colony size and structure, and found links between size and caste of receiving individuals and the type and amount of food received.

Author Contributions

JP and DT conceived the experiments and the experimental design; JP did the experiment and analysed the data; JP and DT wrote the manuscript.

Acknowledgements

Axe 2

We thank Thiéry Dalix from the UMR USRAVE INRA for running the ICP-MS analysis. We thank the beekeeper union “Association Anti Frelon Asiatique” for collecting the nest. We thank Bayer Crop Science, represented by B. Laborie, for the first author’s financial support. The authors declare no conflict of interest. The first author’s funding sponsor had no role in any steps of the study (design, data collection, analyses, writing). We thank Dr Peter Kennedy for assistance with English revisions to the manuscript.

B.2 Rayon d'action de *Vespa velutina* autour de son nid

Connaitre le rayon d'action des individus qui collectent la nourriture est fondamental pour comprendre la zone écologique d'intervention d'une colonie d'insectes sociaux. La mise en place de stratégies de lutte efficaces dépend aussi de ces données comportementales. Le rayon d'action des ouvrières dépend de plusieurs facteurs, entre autres la disponibilité en ressources (nutritives ou matériaux d'entretien de la colonie) et la structure du paysage.

B.2.1 Rayon d'action et capacités de retour au nid

Les insectes sociaux sont des « Central Place Foragers », c'est-à-dire qu'ils évoluent autour de leur colonie, considérée comme élément central, pour collecter des ressources pouvant servir à sa nutrition, mais également à son entretien (eau, matériaux de construction) (Sradbery 1973, Bell 1990). Ils optimisent leurs trajets en effectuant des compromis entre la distance parcourue, la quantité et la qualité des ressources, tout cela en fonction des besoins de la colonie (Bell 1990).

Les insectes sociaux à nourrisseuses aériennes sont capables de naviguer entre leur nid et leurs sites de collecte grâce à différents mécanismes d'orientation comprenant par exemple un compas solaire, du magnétisme (démontré chez les abeilles, Gould 1990), des patterns visuels et des odeurs (pour plus de détails, voir **le manuscrit ci-dessous**). Au-delà de ces vols de routine, il a été montré que ces insectes étaient capables de retrouver leur colonie même après en avoir été déplacés artificiellement à plusieurs km (Fabre 1882). La distance maximale à laquelle des individus d'une espèce sont capables de revenir à leur colonie, le « homing », est ainsi un bon indicateur du rayon d'action maximum pouvant être parcouru pour collecter des ressources par une espèce donnée, et est généralement liée à la taille de l'insecte (démontré par exemple chez les abeilles par Greenleaf *et al.* 2007).

B.2.2 Techniques d'enregistrement et d'analyse des déplacements d'insectes

Etudier le comportement d'animaux et d'insectes dans leur environnement suppose soit **leur marquage par différentes techniques** (Osborne *et al.* 2002, Hagler *et al.* 2016), soit **l'enregistrement de leurs déplacements** (Bell 1990, Reynolds & Riley 2002). Dans cette partie nous n'entrerons pas plus dans les détails de **marquages passifs** classiques tels que : les marquages physiques (morceau d'aile, de patte, encoche), marquages métaboliques (métaux lourds, radioactivité, marquages protéiques comme l'albumine), marquages colorés (peinture, poudres colorées) (Hagler *et al.* 2015). (*Pour plus d'informations sur ces techniques, voir l'introduction du manuscrit 3*).

Nous nous intéresserons ici uniquement aux techniques qui nous paraissent utiles à développer pour suivre les déplacements de *V. velutina* adultes. Celles-ci reposent principalement sur l'usage de radars harmoniques (B.2.2.1), de caméras 3D (B.2.2.2), d'étiquettes magnétiques (RFID) (B.2.2.3) ou d'émetteurs actifs miniaturisés (B.2.2.4).

B.2.2.1 Le radar harmonique

La technique du radar harmonique consiste en la détection par une antenne (Figure 20) d'un réflecteur positionné sur un insecte. Ce type de marquage reconstruit la trajectoire d'un insecte volant dans son ensemble. C'est un outil de premier ordre pour la recherche fonctionnelle et théorique, en milieu semi-contrôlé : il permet, dans des conditions optimales (terrain ouvert, plat), de détecter de manière très précise un insecte dans l'espace en temps réel. Les radars harmoniques ont beaucoup été utilisés pour l'étude de pollinisateurs (Riley *et al.* 1996, Osborne *et al.* 1999, Capaldi *et al.* 2000, Reynolds 2007, Wolf *et al.* 2014)

Axe 2



Figure 20 : Radar harmonique (à gauche) permettant de suivre automatiquement la trajectoire d'insectes portant un réflecteur, ici un bourdon (à droite). Source photo : <http://www.rothamsted.ac.uk/news-views/radar-tracking-reveals-%E2%80%99life-stories%E2%80%99-bumble-bees>

Cependant, plusieurs inconvénients à cette technique existent: une taille du radar souvent imposante (transport par véhicule obligatoire), un rayon de détection assez faible (<900m), un coût très élevé, une grande complexité de fonctionnement, des signaux non individualisables (impliquant la perte de chaque trajet dès que deux individus se croisent), et enfin la nécessité d'effectuer les détections dans des sites d'essais plats et vides (sans échos verticaux (arbres, bâtiments), creux, bosses *etc.*). Une telle technique est actuellement développée sur *V. velutina* en Italie du nord pour tenter de trouver les nids de frelons (Milanesio *et al.* 2016, 2017). Les principaux freins de ce prototype restent actuellement sa faible mobilité (système embarqué sur véhicule), un rayon de détection très faible (150m maximum, à cause de l'angle de vision du radar plus large (angle de 30°C), entraînant une perte de puissance du signal, mais permettant de détecter des signaux en milieux vallonnés), et toujours l'effet écran des échos verticaux (Porporato, résultats présentés au UE Coloss meeting 2016, Mallorca).

B.2.2.2 Les caméras 3D

Associées avec des logiciels complexes de reconstruction des trajectoires, elles permettent, sur une distance assez faible (1-2m max), d'obtenir des informations ultra-précises sur la vitesse, la trajectométrie des insectes, et de décrire des comportements bien spécifiques. Par exemple, en 2016, Stürlz *et al.* ont décrit avec une grande précision la manière dont les guêpes acquièrent des

Axe 2

informations visuelles durant leur vol d'apprentissage, et l'usage qu'elles en font afin de retrouver leur nid (Figure 21).

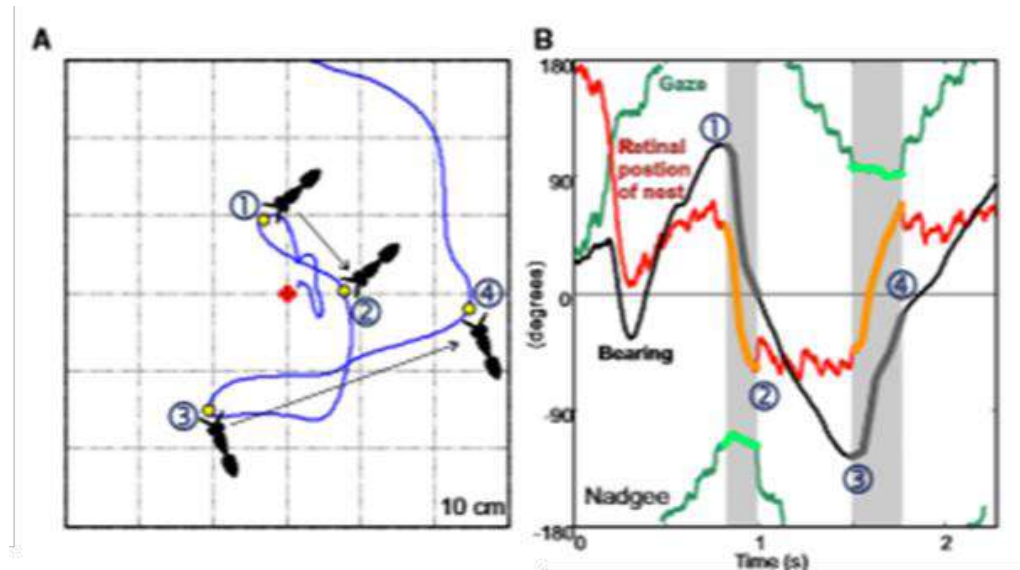


Figure 21 : exemple de résultats d'analyse de trajectoires avec des caméras 3D, Stürzl *et al.*, How Wasps Acquire and Use Views for Homing, *Current Biology* (2016).

B.2.2.3 Emetteurs actifs

Cette technique a été largement utilisée pour l'étude de mammifères et d'oiseaux. Elle repose sur l'usage d'une balise émettrice embarquée par l'animal. La miniaturisation de l'électronique embarquée et des batteries a permis son usage chez les gros insectes, principalement marcheurs (Kennedy & Young 1993), et avec la miniaturisation des batteries, certains coléoptères volants et libellules ont pu être suivies sur plusieurs km (Chapman *et al.* 2004). Nous avons commencé à l'été 2017 une collaboration avec une équipe de chercheurs Anglais, spécialisée dans ce genre de travaux (Peter Kennedy et Juliette Osborne, University of Exeter, projet : Evaluation of technologies for their potential to track Asian hornets (*Vespa velutina*)). Ce projet étant dans la phase de mise au point, nous n'avons pas encore de résultats à présenter dans la thèse. Cependant, des éléments supplémentaires sur ce projet sont présentés dans la discussion de cette thèse.

B.2.2.4 La technique du RFID (Radio-Frequency Identification)

La technique du RFID est un système de marquage passif assez classiquement utilisée en entomologie, et particulièrement pour l'étude d'insectes sociaux, grâce entre autres (1) au suivi individualisé et synchronisé de plusieurs insectes qu'elle permet (un tag = un code = un individu), (2) aux biais très réduits liés à la manipulation des individus ou au poids du système, même chez des insectes volants (Boiteau *et al.* 2009). Un tag est positionné de manière équilibrée et non gênante sur un insecte (en général sur le thorax ou l'abdomen), le code du tag pourra alors être lu lors du passage de l'insecte tagué près d'antennes réceptrices, pouvant être classiquement des portails (Henry *et al.* 2012, Ohashi *et al.* 2010 par exemple), ou des détecteurs mobiles portatifs (permettant par exemple de suivre les déplacements d'insectes de surface ou souterrains (Silcox *et al.* 2011)). Certains modèles de tags ultra miniaturisés font moins d'un demi-millimètre de côté, et peuvent être utilisés pour l'étude de drosophiles ou de fourmis (Moreau *et al.* 2011). Ainsi, les progrès dans **la taille des tags**, dans le **périmètre de détection** des tags par les détecteurs ainsi que dans leur **précision de lecture** ont popularisé l'usage de cet outil pour les expérimentations sur insectes (Figure 22). Dans la recherche sur les pollinisateurs, l'usage de cette technique a permis (1) d'étudier le comportement des insectes : comportement de collecte (Stelzer *et al.* 2010, Ohashi *et al.* 2010, Stelzer & Chitka 2010 (*Bombus* sp.), Rodet & Henry 2014, Tenczar *et al.* 2014 (*Apis mellifera*)), la capacité de retour à la colonie (He *et al.* 2012, Pahl *et al.* 2011), la dérive d'une colonie à l'autre (Sumner *et al.* 2007), les vols nuptiaux (Heidinger *et al.* 2014) *etc.* mais également (2) d'évaluer l'impact de traitements phytosanitaires sur les colonies d'abeilles (Decourtye *et al.* 2011, Feltham *et al.* 2014, Gill & Raine 2014, Henry *et al.* 2012, Schneider *et al.* 2012, Henry *et al.* 2015).

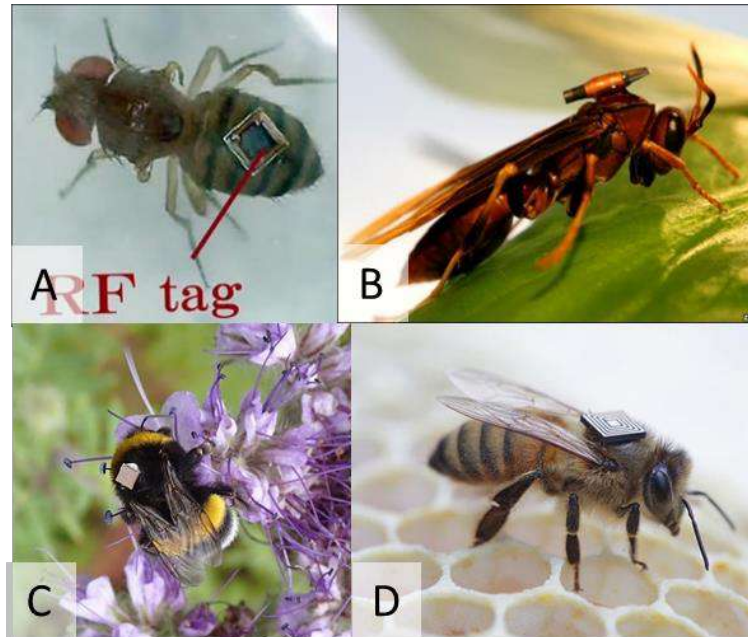


Figure 22 : Exemples d’usages de tags RFID pour le suivi d’insectes. A : sur drosophile (tag de 0.46 mm x 0.48 mm) (Photo SK-Electronics®' Fine Tag) ; B : sur guêpe ([Zoological Society of London] Photo : Queen Mary, University of London); C : sur bourdon (Photo Sigrun Bocksch ©Eurofins Agrosience Services Ecotox GmbH) ; D : sur abeille (Photo CSIRO).

L’ensemble de ces avantages nous ont conduit à choisir cette technique de marquage pour étudier le rayon d’action et l’activité des ouvrières de frelon asiatique, en adaptant le protocole utilisé sur les abeilles par [Pahl et al. 2011](#).

B.2.3 Application de la technique de RFID au frelon asiatique à pattes jaunes *V. velutina*

Cette partie est soumise pour publication à Journal of Pest Science (sept 2017) « Homing behavior and activity of Vespa velutina workers ». (cf Manuscrit 4). Une description résumée axée sur la mise en place technique de l’expérimentation est néanmoins produite ici.

Pour que la technique RFID fonctionne, il faut que les insectes marqués traversent un portail de détection. Chez les frelons, cela revient à positionner le détecteur soit sur les sites de chasse soit au

Axe 2

nid. Pour pallier à l'accès difficile aux nids et au très important comportement de défense du nid par les frelons *in natura*, nous avons encagé un nid, limité les entrées et les sorties à un tunnel et placé les détecteurs RFID à la sortie de ce tunnel. Les ouvrières du frelon asiatique *V. velutina* sont 5 à 8 fois plus grosses qu'une abeille (~50mg vs 250 -400mg), les tags sont donc d'autant mieux adaptés à l'étude de ces insectes. L'objectif de l'étude présentée dans l'article ci-après est de collecter à la fois (1) des données de **capacité de retour à la colonie**, qui permettront d'avoir une idée du **rayon d'action maximum du frelon asiatique autour de son nid** ; mais également (2) des **données de biologie sur le fonctionnement du nid**, grâce au rythme d'activité des différents individus tagués qui s'y trouvent. Nous comparerons cette activité à différents critères à la fois intrinsèques aux frelons tagués (morphologiques), temporels (heure de la journée), mais également à des paramètres climatiques connus pour jouer un rôle dans la navigation des insectes (température, rayonnement, vent, pluie *etc...*).

- *Installation du nid encagé*

Un nid de *V. velutina* de 15cm de diamètre a été collecté à St Médard-en-Jalles (Aquitaine, France) le 28/04/2016. Après l'avoir endormi en le plaçant 24h à 4°C, le nid a été suspendu avec du fil de fer au toit d'une cage sécurisée placée à l'intérieur d'une cabine en fer grillagée de 2m x 1.5m x 2m dans une zone balisée du parc de l'INRA de Bordeaux, sans accès extérieur. Des matériaux de construction pour le nid (carton, bois, écorces) ont été placés dans le fond de la cage, et de la nourriture (miel, pâtée pour chat, sirop) et de l'eau, à volonté dans le plateau d'alimentation. Une semaine plus tard, après une surveillance régulière de l'activité de la colonie, de la reconstruction de l'enveloppe du nid, et du nombre de morts, nous avons estimé qu'une délocalisation du nid n'était plus à craindre, et le tunnel d'accès (10cm de diamètre) reliant la cage à l'extérieur a alors été installé. Le plateau d'alimentation a été fermé, pour inciter les collectrices à sortir de la cage. Les ouvrières ne parvenant pas à trouver la sortie à cause de la transparence de la cage pour l'observation des nids, nous l'avons donc recouverte de carton. Dans ces conditions, le tunnel a été très rapidement adopté et exploré par de nombreuses ouvrières (Figure 23). Deux portails de détection des puces RFID ont alors

Axe 2

été installés (MAJA® reader module 4.2, Mycrosensys) l'un derrière l'autre à l'entrée du tunnel, afin d'obtenir une lecture séquentielle des passages de puces et donc de pouvoir discriminer les entrées des sorties par leur ordre d'activation lors du passage d'un frelon marqué.



Figure 23: (A) Installation en semi-field vu de l'intérieur de la cabine grillagée dans laquelle est installée la cage sécurisée recouverte de cartons contenant le nid (B). (Photos J. Poidatz)

- *Marquage RFID des ouvrières de V. velutina*

Les ouvrières de *V. velutina* ont été capturées au filet entomologique devant l'entrée du nid, puis placées chacune dans un tube Falcon (50ml) avant d'être endormies par hypothermie en plaçant le tube dans de la glace durant 20 min. Les insectes ont alors été pesés (balance radwag, $e=0.001g$), et leur largeur de tête mesurée avec un pied à coulisse électronique (1-150mm, $e=0.01mm$). Puis ils ont été placés dans une boîte à poussoir grillagée (Figure 24 A, B), permettant de leur appliquer sur le thorax une goutte de ciment dentaire (sans odeur, non toxique, séchage très rapide, [Henry et al. 2012](#)), où le microtag (MAJA, Mycrosensys) a ensuite été fixé. Les frelons ont alors été placés dans des cages à température ambiante, avec de l'eau et du miel, pour surveiller leur réanimation.

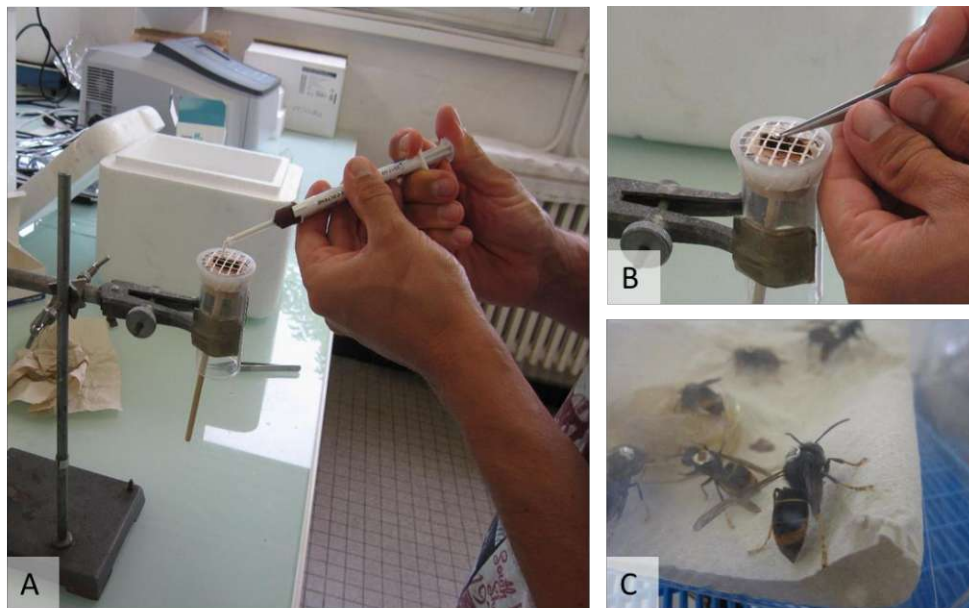


Figure 24 : Marquage de frelons asiatiques avec des puces RFID. A. application d'une goutte de ciment sur le thorax d'un frelon endormi placé dans une boîte à poussoir. B. Placement à la pince fine du microtag sur la goutte de ciment encore fraîche. C. les frelons tagués sont placés dans une cage avec eau et nourriture à température ambiante pour se remettre de l'opération. (Photos J. Poidatz).

Manuscrit 4: Homing behaviour in an invasive honeybee predator**Juliette Poidatz**, Karine Monceau, Olivier Bonnard, Denis ThiérySoumis à *Journal of Pest Science* (sept 2017), under review.**Abstract**

The homing ability is an intrinsic parameter of a species, corresponding to the maximum distance it can travel to return to its nest. It is a good proxy of a species maximum foraging distance. In the context of invasive species monitoring, such parameter is of first interest. *Vespa velutina* is an invasive predator of honeybee extending through Europe. The foraging range of workers around the nest is still unknown and their foraging activity is poorly known. Using RFID technic, the homing ability of *V. velutina* workers was assessed, by releasing 359 individuals at different distance from their colony. Then, daily activity was also monitored. The homing ability of *V. velutina* was evaluated up to 5000 m and was not affected by the cardinal orientation of release point. The lag time to return to the nest increased with the distance of release. Most of the flight activity took place between 07:00am and 08:00pm, hornets doing principally short flights of less than an hour. Foraging range was thus estimated ca. 1000m around the nest. This study of *V. velutina* assisted by RFID tags provides for the first time a baseline for its potential foraging distance that increase our knowledge of this species to i) refine more accurately models for risk assessment and ii) define security parameter for early detection of predation on invasion front.

Key words: Asian yellow-legged hornet, central place foraging, early detection, RFID, invasive species, radio tracking, *Vespidae*

Axe 2

Key message

- The homing ability and foraging range of the invasive bee predator *V. velutina* are unknown.
- As such information are key both for impact prediction and for management, *V. velutina* homing abilities were assessed using RFID technic.
- *V. velutina* maximum homing distance was assessed at 5000m from its nest, and its classic foraging range between 500 and 1000m.
- Homing ability in *V. velutina* was not affected by the cardinal orientation of release, but the distance of release increased its lag time.

Introduction

Central place foraging is largely represented in animals in both vertebrates and invertebrates (Bell 1990). It implies that individuals are able to return to their nest after foraging for resources, to store and share it with the members of the group family (Orians & Pearson 1979, Houston & McNamara 1985, Bell 1990). Nesting site choice results from the trade-off among the habitability of the location, its safety from predators and the distance to resources (Pyke *et al.* 1977, Osborne *et al.* 1999, Williams & Kremen 2007, Osborne *et al.* 2008). To limit foraging costs, individuals optimize different parameters linked to foraging such as the distance they travel (Pyke 1984, Bell 1990). For example, bumblebees are able to adjust their traplines linking different flowers in few foraging boots to reduce the duration of the nectar collection (Lihoreau *et al.* 2012). One limiting key parameter is however the maximal distance an individual is able to travel going back home, called homing ability (Van Nieuwstadt & Iraheta 1996). Homing ability is an intrinsic parameter of a species, while its actual foraging range depends on the resource distributions, abundance and quality (Bacon *et*

Axe 2

al. 1965, Ricketts 2001), the individual capacities (Greenleaf *et al.* 2007), the landscape context (Southwick & Buchmann 1995; Steffan-Dewenter & Kuhn 2003) and climatic parameters. Additionally, homing ability is also closely related to orientation. Studies on homing abilities of diverse organisms (insects and birds for instance) allowed the discovery of compass systems, and include the use of the sun, the stars or geomagnetic fields (Gould 1986, Wehner & Menzel 1990, Goulson & Stout 2001, Collett & Collett 2002).

Homing ability and orientation have been extensively studied in social insects, mostly in pollinators such as honeybees (Abrol & Kapil 1994, Van Nieuwstadt & Iraheta 1996, Pahl *et al.* 2011, He *et al.* 2012) and bumblebees (Goulson & Stout 2001). For example, *Bombus terrestris* workers basically forage in a 1000 m range, but may travel up to 4300 m from their colony to collect valuable resources (Osborne *et al.* 1999, Goulson & Stout 2001, Wolf & Moritz 2008, Goulson & Osborne 2009). They are however able to find their way home up to ca. 10 000 m, what is twice their maximal foraging range (Goulson & Stout 2001). Foraging behaviour being critical to ensure colony survival, understanding how central place foragers control and exploit their environment is a key topic to better understand their ecology that is of special importance for pollinators considering their actual decline (Goulson *et al.* 2015). Interestingly, homing behaviour and orientation have been slightly investigated in Vespidae species probably because their impact on ecosystems is less important than the pollination service (see Schöne *et al.* 1993a, b on diggerwasp, Stürzl *et al.* 2016 on groundwaps, Ugolini 1985, 1986, 1987 on *Polistes* sp. and *Vespa orientalis*). Nevertheless, in the last centuries, several species of *Vespidae* invaded a wide range worldwide with different levels of impact on their new ecosystems (Beggs *et al.* 2011).

The Asian yellow-legged hornet, *Vespa velutina* var *nigrithorax* (Lepelletier 1835) was accidentally introduced into Europe around 2004 from eastern China (Arca *et al.* 2015, see Monceau, Bonnard and Thiéry 2014a for a review). Since its introduction, it has spread

Axe 2

through Europe in Spain (López *et al.* 2011), Italy (Demichelis *et al.* 2013), Portugal (Grosso-Silva & Maia 2012), Germany (Witt 2015), and more recently in UK, Belgium (2016) and Switzerland (2017). *V. velutina* is a generalist predator of arthropods mostly known for its damages on honeybee hives (Abrol 1994, Tan *et al.* 2007, Shah & Shah 1991). This predation pressure can directly and indirectly, by reducing the beehive overwintering abilities, enhance the colony loss risks (Monceau *et al.* 2014a). Thus, *V. velutina* predation is an additional pressure that contributes to bee decline. Furthermore, the action range is of first importance for the monitoring and the potential management of invasive species (Holway & Suarez 1999). This information could help finding colonies, and give a scale for potential control methods application. Moreover, to date only models concerning the nest distribution were done (Villemant *et al.* 2011, Bessa *et al.* 2016, Robinet *et al.* 2016, Franklin *et al.* 2017, Monceau & Thiéry 2017) while risk assessment on apiaries is still missing. Such a model would require estimating the foraging range of *V. velutina* but this later is still unknown.

In order to accurately record the rhythm of entries and exits from the nest of several *V. velutina* workers at the same time over a long period of time, a *V. velutina* colony, maintained in semi-field conditions was equipped with Radio-Frequency Identification (RFID) device. Multiple release of tagged hornet allowed (i) evaluating the homing ability of *Vespa velutina*, and the part of cardinal orientation of the release points and body condition in this behaviour, (ii) describing the activity of the hornets at the individual level within the colony. Two main experiments were thus realized in parallel: (1) the release of individually tagged workers at increasing distance from the nest to measure their homing ability and (2) the daily individual activity for the workers release at the vicinity of the nest.

Axe 2

Material and methods

Biological model and annual life cycle

The life cycle of *Vespa velutina* is annual. During spring, a single gyne (foundress) initiates a nest and lays her eggs. Once the first workers emerge, they quickly replace the queen for all activities except egg laying. The colony grows through the months and the need for proteins to feed the larvae increases too, resulting in an increase of the predation on honeybee hives during summer and fall (Monceau *et al.* 2013c). In mid-September-early October, males and gynes emerge, leave the nest and mate. Only gynes (mostly mated, Poidatz *et al.* unpublished data) hibernate during the winter, while the rest of the colony (males, workers and the old queen) dies (Monceau *et al.* 2014a). The nests of *V. velutina* can be found from underground to the top of the trees. They are paper made, often water hose shaped or spherical, with one unique small entrance.

Nest installation

A 15cm large diameter *V. velutina* wild colony was collected in St Médard-en-Jalles (Aquitaine, France, GPS coordinates: 44°53'35.8"N 0°44'51.4"W) on the 28th April 2016. After a 24hours cooling period at 4°C, the nest was carefully fixed with iron strings inside a cage (Appendix S1), made of mahogany and stainless steel grid and Plexiglas (see Monceau *et al.* 2013a, Couto *et al.* 2014). The cage was then transported inside a 2m x 1.5m x 2m stainless steel grid cabin with a corrugated plastic roof in the INRA de Bordeaux site (La Grande Ferrade, Aquitaine, France, 44°47'30.4"N 0°34'36.9"W). The nest was first installed with no possible outlet from the cage, with food, water and nest construction material (wood, leaves, bark) provided *ad libitum*, to prevent the colony from relocation. After a one-week acclimatization period, a tunnel was installed to connect the cage to the outside (Appendix S1). The inner cage was covered with opaque cardboard sheets, to provide a single light source from the tunnel outlet, and help hornets to find the exit. At the same time, food

Axe 2

previously provided inside the cage was removed. The colony could then grow freely for a week before the installation of the RFID system.

RFID-system

As compared to other techniques such as radio tracking, the RFID technic has several main advantages: it is cheap, allows tagging individuals with a unique combination and limits handling (Boiteau *et al.* 2009, Kissling *et al.* 2014). It was already used for homing studies especially in honeybees (Kissling *et al.* 2014). Two RFID portals A and B (MAJA® reader module 4.2, Mycrosensys) were placed in series on a wood support at the entrance of the tunnel on the outside (Appendix S2) thus recording AB sequence or BA sequence for on- or outgoing movements respectively that were recorded by a RFID HOST controller iID® HOST MAJA (Mycrosensys) (see Henry *et al.* (2012) and He *et al.* (2012) for details).

Hornet tagging

V. velutina workers were collected at their nest entry to be equipped with RFID micro TAG (mic3®-TAG 16Kbit, iID-2000-G, 2.0x1.7x0.5mm). The captured hornets were gently isolated in a falcon tube (50ml) and then anesthetized by keeping the tube on ice for 15-20min. Back to the laboratory, each hornet was immediately weighted (AS 220/C/2, Radwag 2011, precision $\pm 0.0001g$). The largest distance between the eyes was used as for a measurement of head width and obtained with an electronic calliper (precision $\pm 0.01mm$). Prior to fixation, the RFID micro tag was activated and then fixed on the dorsal side of the hornet thorax by using temporary cement (TempoSIL2, Coltène). The tagged hornets were allowed to recover in groups of eight individuals on different meshed boxes (10 x 20 x 10 cm), with water and honey *ad libitum* during a maximum of 3 hours before their release,

Axe 2

either next to the nest or farther for the homing experiment (see below). The monitoring of these tagged hornets was realized from the 8th August 2016 to the 11th November 2016.

Hornets release

To test homing abilities, 318 workers were released at different dates between 2 pm and 5 pm at four different places corresponding to the four cardinal points for each distance from their nest: being at 0, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 m (Figure 1, Apendice S3). Traveling boxes with hornets were placed in an opaque plastic crate both to protect the hornets from heat and also to prevent them from getting any guiding visual information before release. To confirm first results, another release session was done for the distances of 3000, 4000 and 5000m. Each release was realized in similar weather conditions (no rain, sunny days).

To observe hornet activity, an additional batch of 41 workers was released near the nest on three consecutive days (8th, 9th and 10th August 2016) between 2pm and 5 pm.

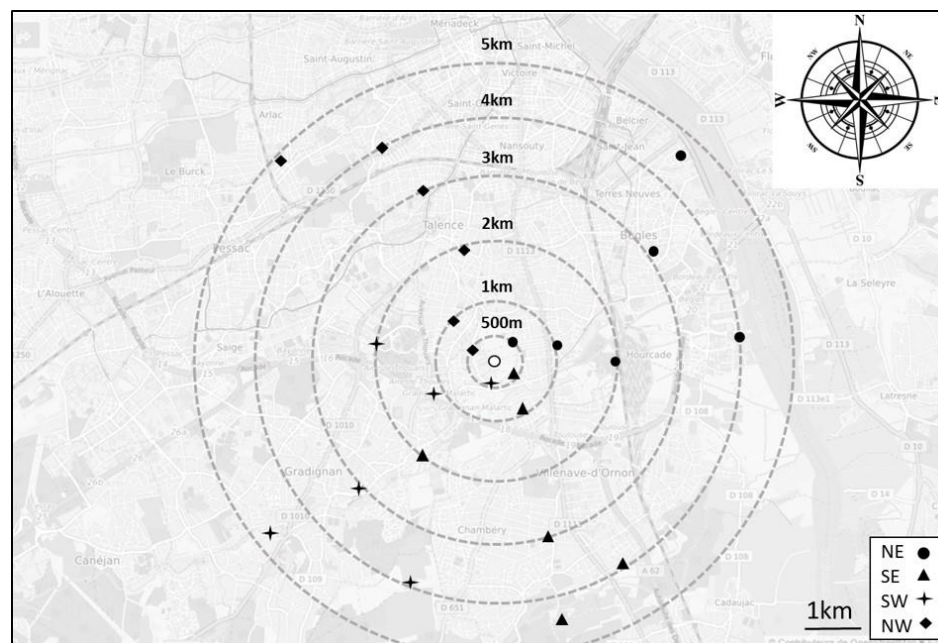


Figure 1. Map of the different release points of the hornet batches. The white dot in the centre stands for the position of the nest. Rounds: NE = North-East; Triangles: SE = South-East; Crosses: SW = South-West; Diamonds: NW = North-West. GPS coordinate are provided in Apendice S3. Background map Openstreetmap©.

Axe 2

Data analysis

Statistical analysis was done using R software (v.3.3.0., R Core Team 2016). First, the sessions 1 and 2 for the release distances of 3000, 4000 and 5000 m were compared using either Fisher's exact test (3000 and 5000 m) or Pearson's χ^2 test (4000 m). The standardized mass (i.e., the body condition) of the hornets was assessed with the scale mass index developed by [Peig & Green \(2009\)](#) based on standardised major axis regression using 'smart' package ([Warton et al. 2012](#)). The effect of the release distance on the probability of returning to the nest was tested using a Cox proportional hazards regression model from 'survival' package ([Therneau 2014](#)). The significance of the overall model including the standardized mass of the hornets and the cardinal point of release was tested using log-likelihood ratio test. As expected in homing experiments, some individuals (n = 205) were still missing at the end of the experiment (minimum time since their release = 320h) and were thus included as censored data. A Tukey post hoc test was used to test the differences among groups (distance and/or cardinal points). The difference in body condition between the hornets that returned to the nest and those that did not come back was tested with Wilcoxon rank sum test.

Individual activity was then analysed based on the individuals, which were released under the nest (N = 71, [Appendice S3](#)) to avoid potential confounding effect of the consequences of flying over long distance. The influence of the weather conditions (temperature, wind and humidity, obtained by the platform INRA CLIMATIK) on the number of trips per day per individual was assessed using a Negative Binomial Generalized Linear Mixed Effects Model (NBGLMM). First, a synthetic variable including the mean daily temperature (mean $\pm$ sd during the experiment: $26.11 \pm 4.35^\circ\text{C}$), humidity ($46.94 \pm 13.80\%$) and wind speed (4.26 ± 1.07 m/sec) was computed with Principal Component Analysis (PCA). The first axis of the PCA (PC1) accounting for 60.71% of the total variance (eigenvalue >1) was therefore used to describe the daily weather conditions (factors loadings:

Axe 2

temperature: 0.70; humidity = -0.70; wind speed: 0.14); positive values of PC1 correspond to warm dry and windy days while positive ones correspond to mild and humid days. The NBGLMM included the identity of the individual as random effect. The number of trips per day and hour was also compared among individuals using Poisson Generalized Linear Model (GLM) including quadratic effects for days and hours (see [Monceau et al. 2013c](#)). For GLM and NBGLMM, the statistical significance of each parameter was tested with likelihood ratio-based χ^2 statistics and Wald test respectively for unbalanced design ([Fox & Weisberg 2011](#)).

The length of each trip was extracted by the automated analysis of RFID tracking data Track-a-forager software (v 1.0, [Van Geystelen et al. 2016](#)). Different parameters were selected: (1) “natural foraging”, because no food source was installed outside, (2) “shared access” for in and out access, (3) and “two” portals. Trips shorter than 20 seconds and longer than 86 400 seconds (i.e. 24h) were not included. The effect of individual body condition on the trip length was tested using Linear Mixed Effects Models (LMM) based on rank transformation, associated with *F*-ratio statistics. This procedure was preferred to the classical non-parametric Friedman tests because the data did not meet the conditions of normality and homoscedasticity ([Baguley 2012](#)).

Axe 2

Results

Homing ability of V. velutina workers

No difference between the two replicates of the 3000, 4000 and 5000 m release distances in the number of individuals coming back to the nest was detected (Fisher's exact test for 3000 m: $P = 1$ and 5000 m $P = 0.24$; Pearson's χ^2 for 4000 m: $\chi^2 = 0$, $df = 1$, $P = 1$). Thus, the two sessions for each distance were pooled for subsequent analyses. All distances pooled, a total of 112 individuals over 318 released individuals were detected back at the nest (Table 1, Figure 2). However, four of them (released near the nest, i.e. 0 m) were excluded from the following analyses because their return was not recorded (only the first exit after the return). The probability of returning to the nest was affected by the distance of release (Cox proportional hazard model: $\chi^2 = 161.69$, $df = 6$, $P < 0.0001$, Figure 2) but not the body condition of the hornets ($\chi^2 = 2.82$, $df = 1$, $P = 0.09$) or by the orientation (cardinal points) of the release ($\chi^2 = 2.97$, $df = 3$, $P = 0.39$). Three different groups based on the release distances did not differ: 0 and 500 m (Tukey test, $P = 0.95$), 1000 and 2000 m ($P = 1$) and 3000, 4000 and 5000 m ($P > 0.15$ in all cases). These groups differed from each other ($P < 0.05$) except in the case of 1000 vs. 4000 m that is marginally non-significant ($P = 0.08$). The homing rate decreased of ca. 50% from a group distance to the further one (Figure 2). Hornets coming back to the nest and those considered lost (i.e. that did not return to the nest during the experiment) differed in their body condition (Wilcoxon rank sum test: $W = 12934.5$, $P = 0.01$): the former were lighter (median [95%CI]: 284.1 [273.3; 294.1] mg) than the latter (295.8 [286.8; 299.9] mg).

Axe 2

Table 1. Homing rate, time to return and speed of *V. velutina* workers in function of their release distances, and the cardinal points of release (NE= North-East, NW= North-West, SE= South-East, SW=South-West). The sample size for each category is also given (N).

Release distance (m)	N	homing rate (%)					homing time (h) mean $\pm$ sd	homing speed (m.h ⁻¹)
		NE	NW	SE	SW	Overall I		
0	71	-	-	-	-	83.78	2.40 $\pm$ 2.01	-
500	32	100.0 0	75.00	12.5	100.00	90.91	3.91 $\pm$ 6.73	484.8 $\pm$ 596.64
1000	32	37.50	50.00	25.00	62.50	43.75	8.02 $\pm$ 19.17	862.17 $\pm$ 691.25
2000	32	62.50	37.5	62.50	37.50	50.00	16.75 $\pm$ 12.21	375.27 $\pm$ 451.97
3000	64	12.50	12.5	18.80	12.50	14.06	80.11 $\pm$ 53.23	56.60 $\pm$ 39.68
4000	64	18.80	25.00	25.00	18.80	21.88	77.53 $\pm$ 53.34	92.17 $\pm$ 73.03
5000	64	6.25	6.25	0.00	6.25	4.69	176.17 $\pm$ 118.3	36.53 $\pm$ 18.53

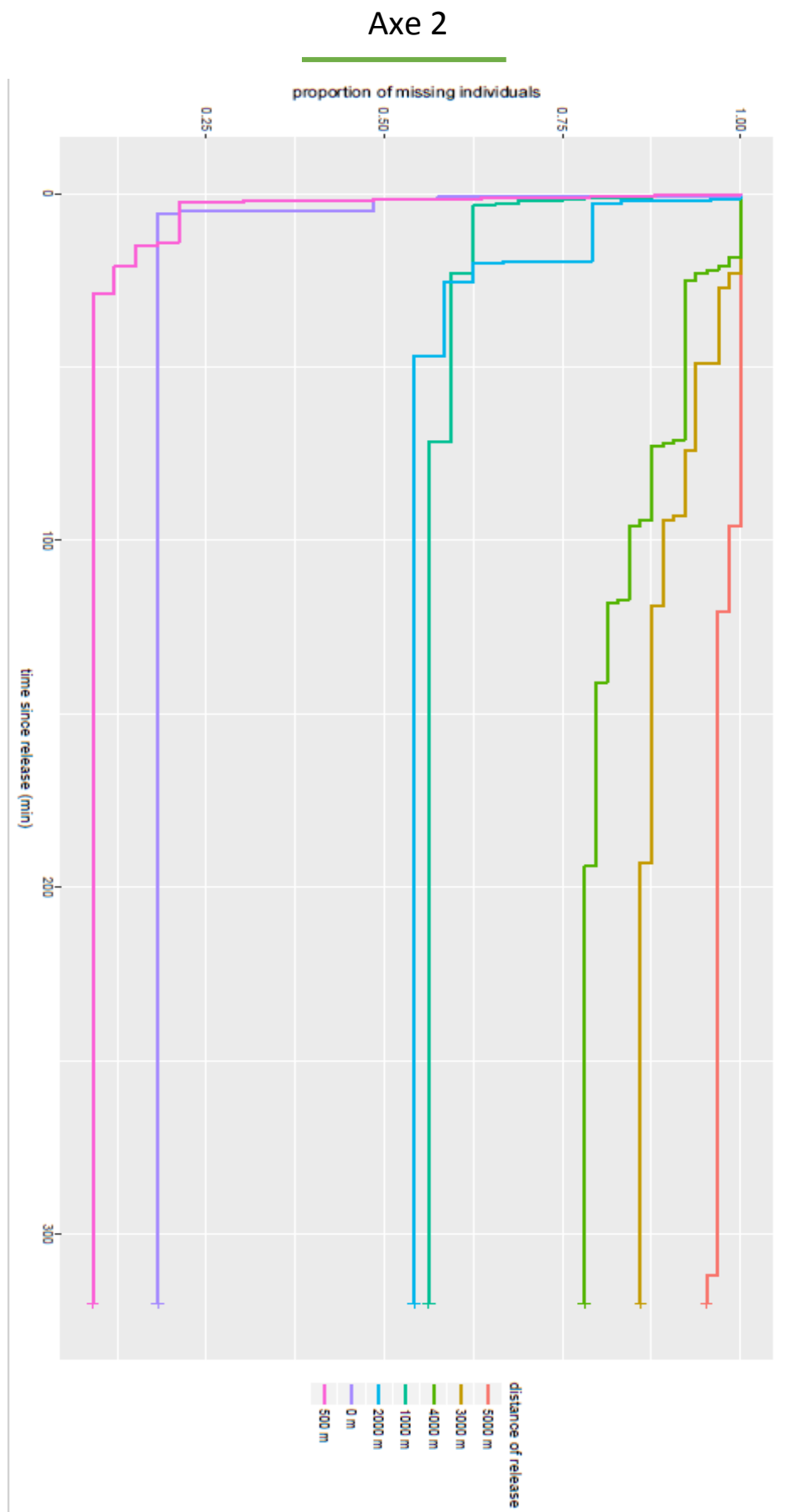


Figure 2. Homing time to nest of tagged workers of *V. velutina* in function of their release distance from nest.

Axe 2

Individual flight activity

Considering the 71 individuals released at the nest (4467 trips), the individual average duration period of activity lasted 4.98 ± 4.44 days (mean $\pm$ sd, range: 1-26 days of detection) with an average 12.62 ± 10.97 trips per day per individual. Ninety eight percent of the trips were recorded between 7:00am and 08:00pm; the remaining trips (72) made during the night were excluded from subsequent analyses.

The number of trips per day and individual was affected by the weather conditions (NBGLMM, estimates $\pm$ sd = 0.15 ± 0.04 ; Wald test: $\chi^2 = 13.15$, df = 1, $P < 0.001$): the number of trips increased with higher temperature and lesser humidity. The number of trips differed among individuals with no clear pattern (Poisson GLM: $\chi^2 = 353.85$, df = 70, $P < 0.0001$, [Figure 3](#)) and hours of the day (hours: $\chi^2 = 17.61$, df = 1, $P < 0.0001$; hours² $\chi^2 = 15.94$, df = 1, $P < 0.0001$) with a maximal number of trips was reached in early afternoon (02:00 pm – 03:00 pm, [Figure 4](#)). There was no difference among days (days: $\chi^2 = 2.53$, df = 1, $P = 0.11$; days²: $\chi^2 = 0.55$, df = 1, $P = 0.46$) or their interactions (hours x individuals: $\chi^2 = 40.73$, df = 61, $P = 0.98$; hours² x individuals: $\chi^2 = 39.55$, df = 61, $P = 0.98$; days x individuals: $\chi^2 = 41.96$, df = 48, $P = 0.72$; days² x individuals: $\chi^2 = 46.61$, df = 48, $P = 0.53$).

Trip duration was divided into 2 samples: long trips that lasted more than 1 hour and short trips that lasted less than 1 hour ([Figure 5](#)). Long trips represented 3.60% of the trips and range more than 1 hour to ca. 22 hours. These trips were not considered in the following analyses. Most of the trips were thus short trips of ca. 949.7 ± 750.46 s (mean $\pm$ sd, ca. 15 min 50 $\pm$ 12 min 30, range: 68s to 3597s). Trip duration was not influenced by body mass ($F = 0.34$, df = 1 and 24, $P = 0.57$).

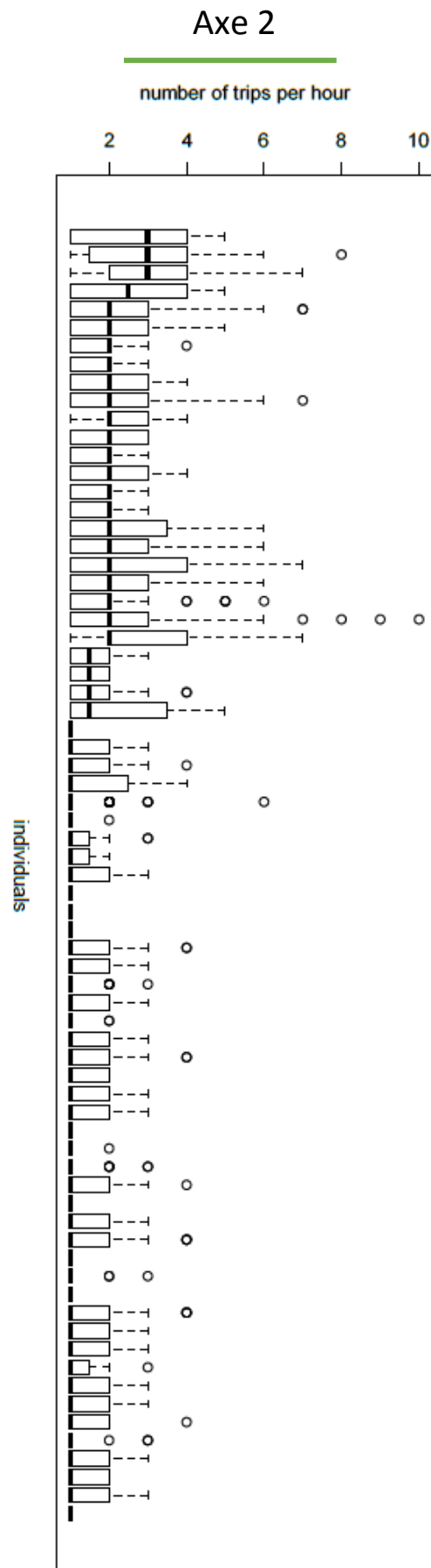


Figure 3: Number of trips per hour of the different *V. velutina* workers (N=71 individuals).

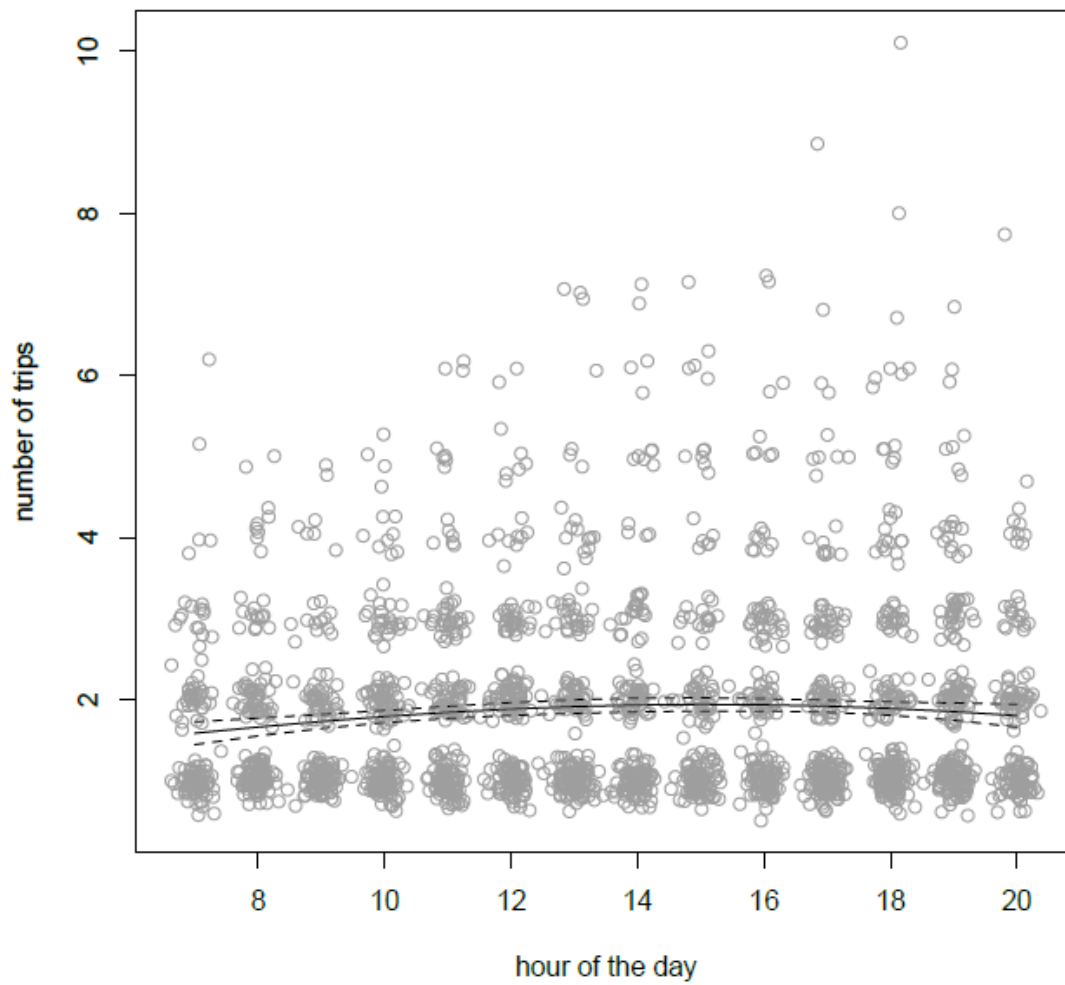


Figure 4: Number of trips of the different *V. velutina* workers in function of the hour in the day. The fitting of the corresponding GLM-Poisson is represented with the solid line, and the $\pm 5\%$ errors in dotted lines.

Axe 2

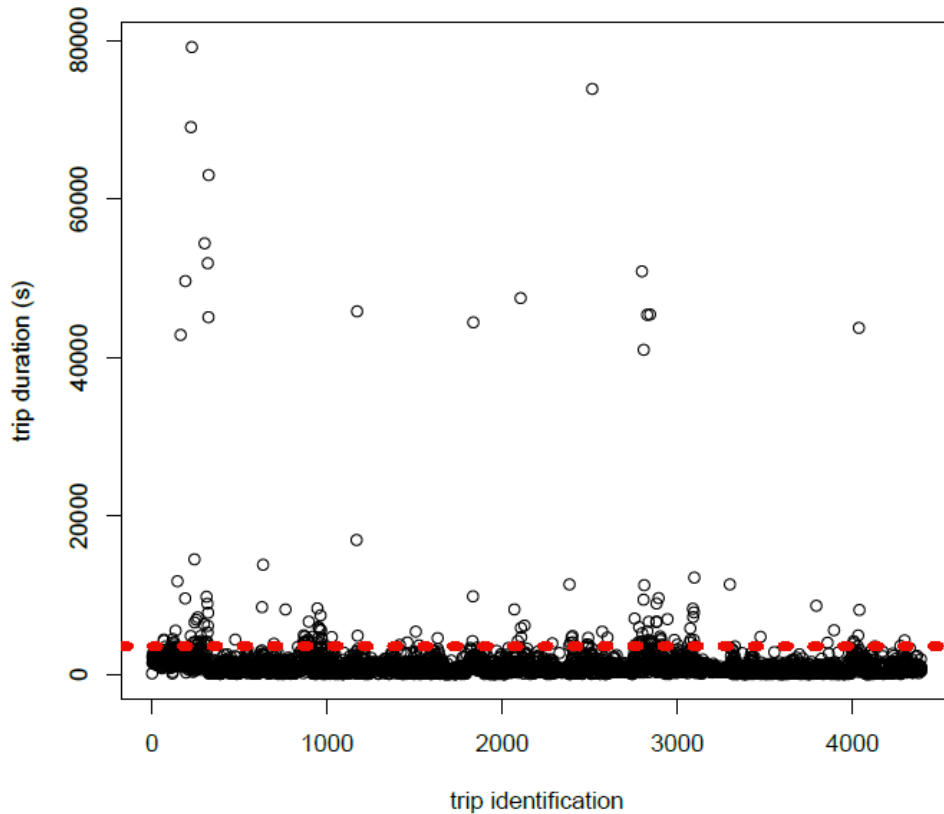


Figure 5: Global trips duration in *V. velutina* workers. The red dotted line at 3600 s = one hour, separates short trips from long trips in our analysis.

Discussion

Homing is a critical behaviour for central forager and represents an upper limit of the distance an individual is able to travel. In the case of invasive and pest species, this parameter should be taken into account in impact models. Homing ability and nest activity were here assessed for the first time on the hornet *V. velutina* using RFID technic on a semi-field nest.

Homing ability of *V. velutina* decreases gradually with the distance of release: most of the individuals flew back when released up to 500 m, half of them returned to the nest when released up to 2000 m and less than a quarter were retrieved when released farther than 3000 m. These data show that *V. velutina* workers can find their way back over several kilometres.

Axe 2

However, their foraging range is probably lower than 2000 m, probably in a radius around the nest of 500 m. These results are congruent with the data available in other *Vespa* sp. Indeed, homing ability in *V. orientalis* is ca. 1000 m with a probable territory range of 500 m (Ugolini, Kessler & Ishay 1987). *V. orientalis* and *V. velutina* being of similar size, finding congruent capacity is not surprising. In the case of *V. velutina*, almost 5% of the individual released at 5000 m were able to find their nest. This long distance can be compared to the foraging range of the giant Japanese hornet *V. mandarinia*, is ca. 1000-2000m, with a maximal distance of 8000 m (Matsuura & Sakagami 1973). This experiment also shows that homing behaviour is not affected by the orientation of the release point. This suggests that compass information due to sun orientation or magnetic fields might not be involved in this homing behaviour, what is congruent with previous findings in *Vespidae*. Orientation system mostly relies on visual (Zeil 1993), olfactory (Takagi *et al.* 1980) and tactile cues (Jeanne & Taylor 2009). Vespids learn visual information during an orientation flight, to find their path to or back from foraging sites (Ugolini 1987, Raveret Richter & Jeanne 1991; see Raveret Richter (2000) for a review). In this orientation flight, the individual flies along ever increasing arcs around the nest that allow combining flight trajectory (arcs) and gaze orientation, to acquire sufficient visual cues for homing (Zeil 1993, Toh & Okamura 2003, Stürzl *et al.* 2016). One should however consider that workers' previous experience was not controlled in our experimental design so some individuals might have already experienced long trips from their nest that could have facilitated their return. Returning workers had a smaller body index (i.e. lower mass for a similar size) that could reflect their age. Indeed, worker body mass increases through the season probably because the consecutive cohorts of workers benefit from increasing food provided during larval stage (Matsuura & Yamane 1990, Monceau *et al.* 2013b). Individual with lower body mass could be older individuals, thus with more experience. Most of the tagged workers come back to the nest within the first

Axe 2

24 hours. However, some of them return to the nest more than four days (i.e., 100 hours) after their release. Such duration was also observed in *Bombus terrestris* (Goulson & Stout 2001). This means that individuals may survive for several days outside their nest and thus questions their travel path during this episode. Considering that *V. velutina* nest density in Bordeaux suburbs is quite high, one hypothesis is that individuals may have wandered from colonies to colonies since several non-nest mates were observed as accepted by other colonies (K. Monceau and O. Bonnard, pers. obs.). It also questions the fate of those that never come back to the nest: lost, died or fully accepted by other colonies. However, this question cannot be answer with the RFID technique and other tracking devices are still not usable to cover such long distances (see Milanesio *et al.* 2016, 2017).

Up to date, only direct observations or video records have allowed monitoring the activity of *V. velutina* (Perrard *et al.* 2009, Monceau *et al.* 2013b, 2013c, 2017). Our results are in line with these previous studies. First, most of the activity is realized between 07:00 am and 08:00 pm confirming that *V. velutina* is diurnal; some individuals still have a nocturnal activity (only 2% of the activity). *V. crabro* is also active with low light intensity but in a higher propensity (Kelber *et al.* 2011). Second, the worker activity is driven by weather conditions that is quite classical in *Vespidae* (Cruz *et al.* 2006, da Rocha & Giannotti 2007, Kasper *et al.* 2008; Canevazzi & Noll 2011, de Castro *et al.* 2011). The observed enhancement of the hornet activity during the day with a maximum around noon, already observed by video analysis (Monceau *et al.* 2017), can be either attributed to an increase in temperature or in UVB solar irradiation. Indeed, *V. orientalis* is able to convert solar into metabolic energy with photovoltaic like cuticle cells (Ishay & Kirshboim 2000, Ishay 2004, Volynchik *et al.* 2008, Plotkin *et al.* 2010). Such a reaction has not been investigated in *V. velutina* for now but should receive attention as it would also explain his performance in hovering for preying honeybees (Monceau *et al.* 2013c).

Axe 2

Contrary to previous studies, RFID allows identifying unique individual behaviour. Thus, the duration of each trip can be accurately quantified with RFID: 95% of the flights lasted less than 1 hour. Flying speeds of *V. velutina* workers are so far unknown, but in *V. crabro*, it has been estimated at 1.86m.s^{-1} (i.e., 6.7 km.h^{-1}) (Spiewok & Schmolz 2005). If both species fly at a similar speed and considering the average trip duration being 15 min, *V. velutina* workers probably forage within less than 1000 m away from their nest. Moreover, predation includes catching and processing the prey and then coming back to the nest with an additional load that impacts the flying speed, thus they probably forage in a 500-800m diameter perimeter. This means that if predation is detected on hives, *V. velutina* nest should be searched within a radius of at least 1000 m. Although, this approximation is based on a specific area where resources (i.e. honeybee hives) are common and thus should be replicated in a different area. Nevertheless it is congruent with the homing behaviour experiment, which does not depend on resource richness.

This work explored for the first time homing abilities using RFID technic in an invasive hornet species threatening honeybees, and allowed us to evaluate the boundaries of its foraging range. Radio tracking allows tracking hornets only over short distances, and it is not accurate enough (Milanesio *et al.* 2016, 2017): the RFID provides the best compromise to acquire new information on workers flight behaviour that are of first interest for the monitoring and control of this special invasive hornet. Invasive social insects, especially Vespids, can deeply affect their environments (Beggs *et al.* 2011, Bradshaw *et al.* 2016), and their impact is obviously related to foraging range. How animals use their environment and their movements are key parameters in biological invasion (Holway & Suarez 1999) and these parameters should be implanted in future impact models.

Author Contributions

Axe 2

JP, OB and DT conceived the ideas and designed methodology; JP and OB collected the data; JP and KM analysed the data; JP, DT and KM wrote the manuscript.

Acknowledgements

We thank the bee team of the INRA Magneraud, P. Aupinel and J.-F. Odoux, for lending us components of the RFID material and helping us to use it. We thank the beekeeper union “Association Anti Frelon Asiatique” and especially J.-P. Croce for collecting the nest. We thank Bayer Crop Science, represented by B. Laborie, for the first author financial support. The authors declare no conflict of interest. The first author’s funding sponsor had no role in any steps of the study (design, data collection, analyses, writing). We thank A. Foucard-Wellwood for English language proofreading.

Supplementary material

Appendix S1. Installation of the nest within the cage inside the cabin (side view).

Appendix S2. RFID portal design.

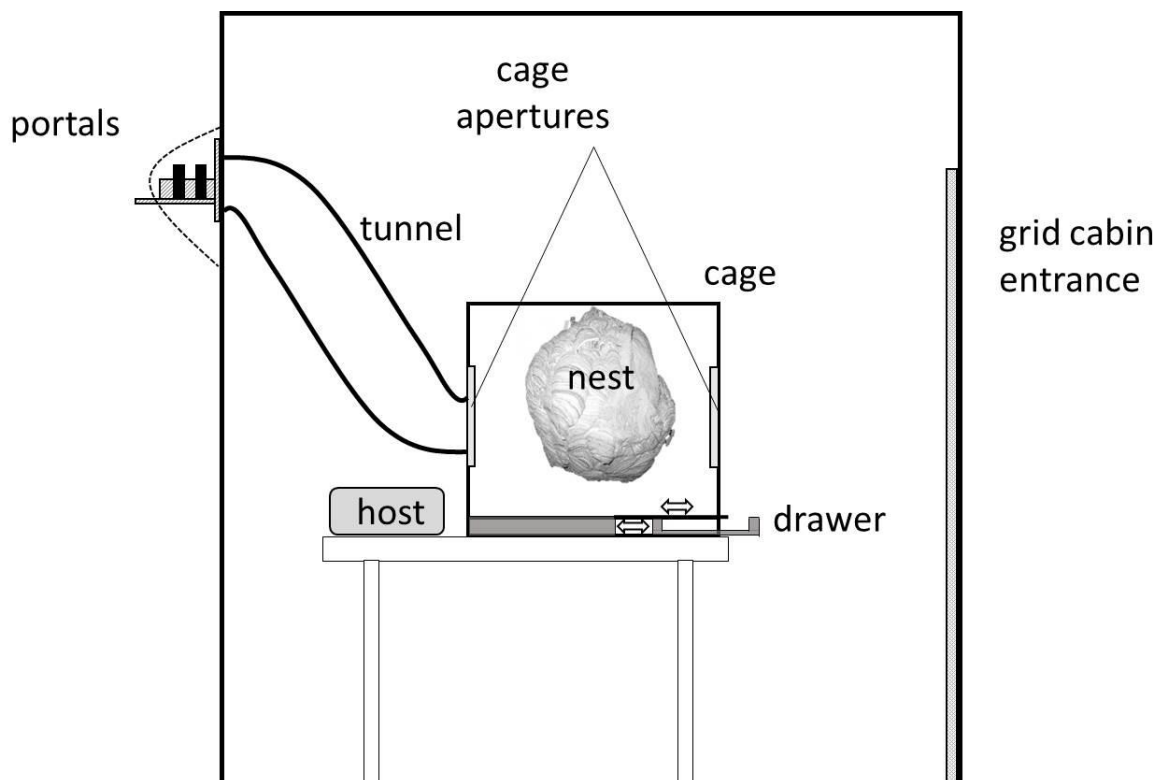
Appendix S3. GPS coordinates of the different release points of the hornets at different distances from the nest.

Axe 2

Appendice S1. Installation of the nest within the cage inside the cabin (side view).

The nest is fixed with iron strings inside the cage made of mahogany stainless steel grid and Plexiglas. This cage was equipped with two secured apertures and one secured covered sliding plate and a mobile drawer for food and water supply. The cage is placed on a table inside a 2m x 1.5m x 2m stainless steel grid cabin with a corrugated plastic roof.

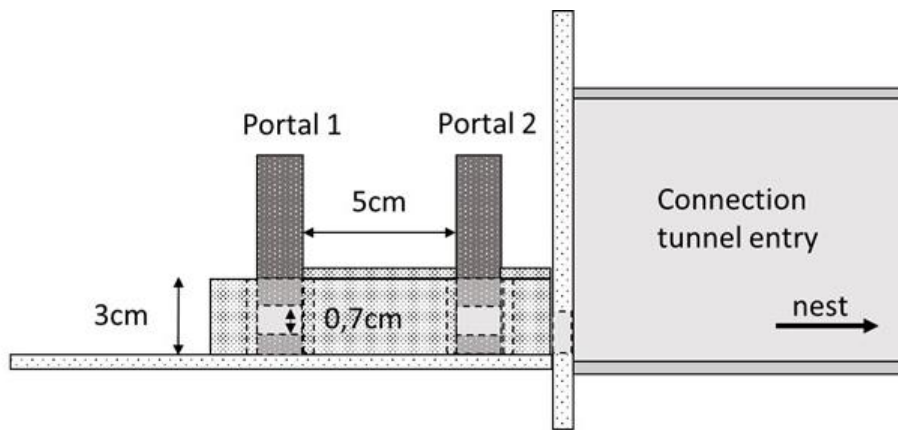
Once allowed to leave the cage, the hornets can access the outside or enter the nest via a 10 cm diameter transparent plastic tunnel connecting the cage to the outside. The RFID portals, covered with a plastic copper (see details in [Appendice S2](#)), are positioned at one extremity of the tunnel so the hornet must pass through the portals to go in and out. All movements are recorded by A RFID host controller iID® HOST MAJA (Mycrosenssys).



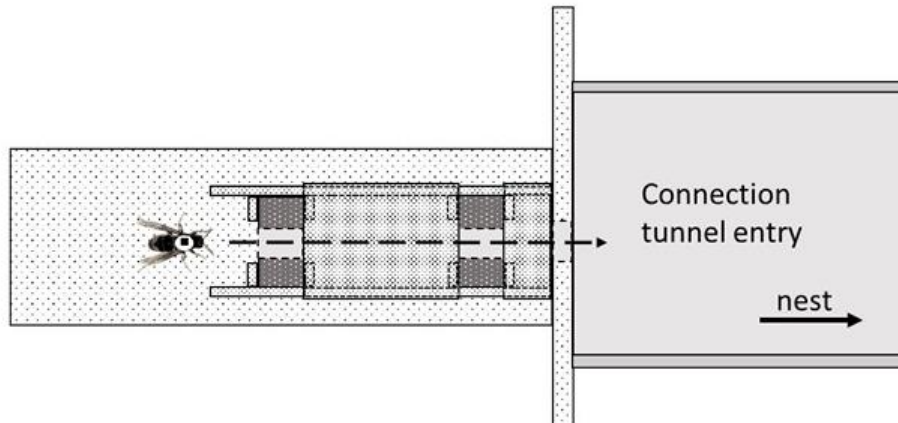
Axe 2

Appendice S2. RFID portal design. Two RFID portals A and B (MAJA® reader module 4.2, Mycrosensys) were placed on a 5 cm long wood support, one behind another at the entrance of the tunnel on the outside. Thus ongoing (AB sequence) and outgoing individuals (BA sequence) could be sorted out and are recorded by the RFID host controller. Hornets are tagged with RFID micro TAG (mic3®-TAG 16Kbit, iID-2000-G, 2.0x1.7x0.5mm).

From the side



From above



Axe 2

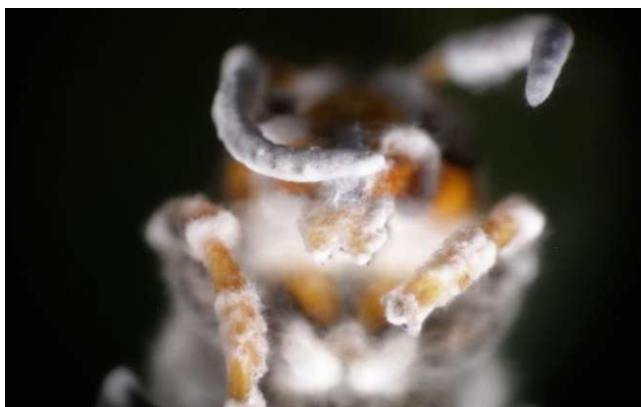
Appendice S3. GPS coordinates of the different release points of the hornets at different distances from the nest. For 3000, 4000 and 5000m distances of release, 2 replicates were made.

Distance (m)	Cardinal point	GPS coordinates	Date	Number of hornets
0	-	44°47'30.4"N 0°34'36.9"W	5 August 2016	5
			8-10 August 2016	36
			30 August 2016	30
500	NW	44°47'37.6"N 0°34'32.3"W	16 August 2016	8
	SE	44°47'16.2"N 0°34'24.8"W	16 August 2016	8
	SW	44°47'08.0"N 0°34'35.8"W	16 August 2016	8
	NE	44°47'33.2"N 0°34'55.6"W	16 August 2016	8
1000	NE	44°47'20.4"N 0°33'49.1"W	16 August 2016	8
	SE	44°46'55.5"N 0°34'16.2"W	17 August 2016	8
	NW	44°47'13.1"N 0°35'30.8"W	17 August 2016	8
	SW	44°47'49.3"N 0°35'13.2"W	17 August 2016	8
2000	NE	44°47'36.1"N 0°33'12.4"W	28 September 2016	8
	SE	44°46'42.4"N 0°35'12.1"W	28 September 2016	8
	SW	44°47'31.3"N 0°36'02.0"W	28 September 2016	8
	NW	44°48'38.7"N 0°35'04.7"W	28 September 2016	8
3000	NE	44°48'08.8"N 0°32'34.9"W	18 August 2016	8
			10 October 2016	8
	SE	44°45'50.4"N 0°34'03.7"W	18 August 2016	8
			10 October 2016	8
	SW	44°46'18.2"N 0°36'22.1"W	18 August 2016	8
			10 October 2016	8
	NW	44°48'47.4"N 0°34'58.3"W	18 August 2016	8
			10 October 2016	8
4000	NE	44°47'43.9"N 0°31'41.0"W	29 September 2016	8
			11 October 2016	8
	SE	44°45'38.1"N 0°33'03.7"W	29 September 2016	8
			10 October 2016	8
	SW	44°45'33.2"N 0°35'57.3"W	29 September 2016	8
			10 October 2016	8
	NW	44°48'53.0"N 0°36'32.8"W	29 September 2016	8
			11 October 2016	8
5000	NE	44°49'08.8"N 0°32'20.5"W	18 August 2016	8
			10 October 2016	8
	SE	44°44'51.7"N 0°33'53.2"W	18 August 2016	8
			10 October 2016	8
	SW	44°45'14.8"N 0°37'31.5"W	18 August 2016	8
			18 October 2016	8
	NW	44°48'39.9"N 0°37'42.7"W	18 August 2016	8
			18 October 2016	8

AXE 3 : VERS DES OPTIONS DE BIOCONTRÔLE DE *VESPA VELUTINA* ?

Dans l'**Axe 1**, nous avons évoqué le fait que le contrôle des reproducteurs chez *V. velutina* serait difficile à mettre en place, sachant (1) que les mâles et les gynes sont produits en grande quantité dans chaque colonie, (2) que les mâles ont des réserves de spermatozoïdes largement excédentaires, chacun d'eux suffit largement en théorie pour féconder une voir plusieurs femelles ([Article 1](#)), (3) que les fondatrices ont un développement très précoce au printemps et sont très fertiles ([Manuscrit 2](#)) et que leur capture n'impacte que de façon très marginale le niveau de population global. Une autre stratégie, plus axée sur le contrôle des colonies doit donc, selon nous, être envisagée. Je me suis donc intéressée dans cet **Axe 3** à des options de biocontrôle *via* en particulier l'usage de champignons entomopathogènes. Les résultats présentés dans l'**Axe 2** renforcent cette approche, en particulier sur le rayon d'action moyen et maximum des fourrageuses et leur rythme quotidien d'activité ([Manuscrit 3](#)), et sur la quantification des échanges par trophallaxie entre les différents membres de la colonie au cours de son développement ([Manuscrit 4](#)), dépendants de sa structure et du type de nourriture distribué.

Nous allons maintenant dans ce dernier axe **évaluer certaines méthodes de contrôle biologique applicables à *V. velutina***. Comme développé en introduction, la destruction des nids se fait actuellement majoritairement par intervention humaine, mais sachant que la détection et l'accès aux nids est souvent difficile, nous envisageons ici de travailler sur une méthode permettant d'introduire naturellement des pathogènes dans les colonies.



V. velutina infecté par *B. bassiana* Photo de R. Lopez Plantey.

C.1 La lutte biologique

La lutte biologique est définie, entre autres, par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique) <http://www.iobc-global.org/> comme étant l'« Utilisation par l'Homme d'ennemis naturels tels que des prédateurs, des parasitoïdes ou des agents pathogènes pour contrôler des populations d'espèces nuisibles en dessous d'un seuil de nuisibilité ». Mais une définition beaucoup plus large a été adoptée par l'EPA (Agence de Protection Environnementale des Etats Unis) pour décrire les biopesticides. Ces derniers peuvent être dérivés de matériaux biologiques naturels classés en trois catégories : les biopesticides microbiens (bactéries, champignons, virus, algues *etc.*), les biopesticides d'origine végétale et les biopesticides biochimiques (substances naturelles sans effet toxique direct, mais un effet sur la croissance ou la reproduction) (Suty 2010).

Plusieurs stratégies de lutte biologique peuvent ainsi être mises en place et sont listées ci-après (liste inspirée de Suty 2010).

- **La lutte biologique par acclimatation (classique):** consiste à introduire de manière **inoculative mais non renouvelée** puis de **favoriser l'installation à long terme** d'un agent de biocontrôle dans un nouvel environnement, pour lutter contre une espèce cible exotique invasive. Par exemple, suite à la pullulation de jacinthes d'eau invasives *Eichhornia crassipes* sur des grands lacs africains, un charançon *Neochetina spp.* issu de l'aire native de la jacinthe a été introduit, ce qui a permis aux lacs de retrouver leur équilibre naturel (Wilson *et al.* 2007).
- **La lutte biologique inoculative :** le but de cette stratégie est de maintenir un niveau de population d'un ravageur sous le seuil de nuisibilité pendant la durée d'une culture, en effectuant des **petits lâchers réguliers de l'agent de biocontrôle en prévention et tout le long de la saison de production**. Un *baculovirus* (OpMNPV) est par exemple utilisé de cette manière pour lutter contre les populations de chenille à houppes du sapin, *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) (Hunter-Fujita *et al.* 1998). Ces baculovirus ne sont létaux que pour les stades larvaires, mais les adultes peuvent servir de vecteurs.

Axe 3

- **La lutte biologique inondative** : cela consiste en des lâchers de **grandes quantités d'agents de biocontrôle de manière plus curative**. On applique ici par exemple l'agent à une population de ravageurs problématique. Cette méthode est le plus souvent mise en place en agriculture, comme par exemple avec *Bacillus thuringiensis* pour lutter contre les processionnaires du pin, les noctuelles défoliatrices en culture maraichères, et les tordeuses de la vigne (ex [Sanahuja et al. 2011](#)).
- **La lutte biologique de conservation** : elle consiste à **favoriser les populations locales naturelles d'agents de biocontrôle** afin d'en augmenter l'efficacité dans la lutte contre les ravageurs. Les agents de biocontrôle sont déjà présents sur site, et l'objectif consiste donc à les attirer dans les parcelles à protéger, mais aussi à diminuer leur mortalité, favoriser leur reproduction et leur efficacité biologique. Cela passe généralement par l'aménagement d'habitats semi-naturels comme sources de refuges ou de nourriture, l'adaptation des pratiques culturales (diminution de pesticides ou de pratiques destructrices comme les labours ou le désherbage chimique pouvant perturber les agents) et le contrôle des prédateurs des agents ([DeBach & Rosen 1991](#)).

De manière générale, l'objectif des méthodes de lutte biologique n'est pas l'éradication d'espèces nuisibles, concept rarement envisageable en agriculture, mais bien la diminution de leurs populations en dessous de leur **seuil de nuisibilité**¹ ([Figure 25](#)).

¹ Seuil de nuisibilité : le niveau des populations d'organismes nuisibles qu'un agriculteur peut admettre sans grand risque pour sa récolte, ou sans que la dépense en pesticides ne dépasse le gain de récolte.

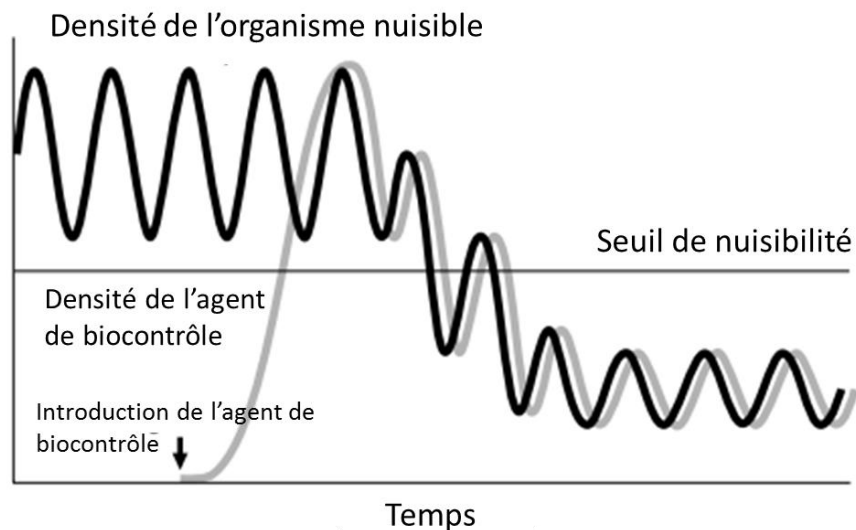


Figure 25 : Représentation schématique du fonctionnement recherché d'un programme de biocontrôle, où la population de l'organisme à contrôler diminue de manière à rester sous le seuil de nuisibilité suite à l'introduction de (ou de l'ensemble) d'agent(s) de biocontrôle. (Adapté de [Briese 2000](#)).

C.1.1 La lutte microbiologique entomopathogène

Les agents microbiens (bactéries, virus ou champignons) sont bien connus depuis les travaux de Louis Pasteur sur la flatide du ver à soie en fin de XIX^{ème} siècle. Ces agents ont alors été très tôt utilisés en lutte biologique contre les insectes ravageurs de cultures ([Le Moul 1890](#)) et couramment invasifs. Depuis le début des années 2000, à l'aire de la prise de conscience de l'écologie et de l'importance de la durabilité dans le contrôle de nuisibles, l'usage de pathogènes d'insectes en lutte biologique est un champ de recherche en constante expansion ([Lacey et al. 2015](#)).

Suivant les espèces, les agents microbiens de biocontrôle sont présents dans différents compartiments environnementaux (sol, air, eau) et peuvent infecter leur hôte soit par ingestion, soit par contact avec la cuticule ([St Leger et al. 1988a, b](#)) ou en entrant par d'autres orifices ([Figure 26](#)) ([St Leger 1993](#), [Hajek & St Leger 1994](#)). Le pathogène se multiplie alors dans l'hôte en lui causant des dommages par destruction des tissus, par septicémie ou toxémie entraînant sa mort plus ou moins immédiate. Tous ces micro-organismes possèdent des formes de résistance leur permettant de persister dans

l'environnement et de perpétuer leur cycle de vie (Fargues & Robert 1985, Bidochka *et al.* 1998, Meyling & Eilenberg 2007).

Parmi les micro-organismes utilisés en lutte biologique, appartiennent à plus de 700 espèces de microchampignons entomopathogènes (Starnes *et al.* 1993) qui jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Ferron 1978, Wraight & Roberts 1987, Butt *et al.* 2001). La plupart des champignons entomopathogènes appartiennent au sous-taxon des *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina* et *Deuteuromycotina*. Le plus grand nombre d'entre eux se trouve dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisées en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (*Fungi imperfecti*). Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga* sont les plus utilisées en lutte biologique (Wraight & Roberts 1987, Goettel & Inglis 1997). Le principal avantage des micro-champignons est leur aptitude à infecter l'hôte **par ingestion ou par simple contact à tous les stades, œuf, larve et adulte** (Hajek & St. Leger 1994). Ils peuvent être produits en masse à moindre coût et peuvent être appliqués avec les méthodes conventionnelles. Les principaux facteurs limitant l'utilisation en champ des microchampignons sont abiotiques : en effet, la plupart des spores des souches classiquement utilisées sont sensibles aux UV (la formulation peut améliorer cet aspect Inglis *et al.* 1995), ont besoin d'une certaine humidité pour se développer (Inglis *et al.* 2000), et réagissent souvent mal aux fortes oscillations de température (Inglis *et al.* 1999). Cela renforce l'importance de tenir compte de **l'écologie des champignons** en eux-mêmes et de favoriser autant que possible des souches d'entomopathogènes locales dans le développement de stratégies de lutte, car elles seront adaptées naturellement aux contraintes climatiques de leur environnement d'utilisation (Vega *et al.* 2009).

C.1.2 Les mécanismes infectieux des entomopathogènes

Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes qui sont **l'adhésion, la germination, la différenciation, et la pénétration**. L'**adhésion** est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec les cellules

tégumentaires de l'insecte (Vey *et al.* 1982, Boucias & Pendland 1991, Bidochka & Small 2005, Ortiz-Urquiza & Keyhani 2013). Cette phase se scinde en deux étapes distinctes : la première, passive, où l'attachement à la cuticule est réalisée grâce à des forces hydrophobiques et électrostatiques (Butt 1990, Boucias & Pendland 1991) et la seconde, active, caractérisée par la production d'un mucilage qui va engendrer une modification épicuticulaire (Wraight *et al.* 1990) aboutissant à la germination (Figure 26).

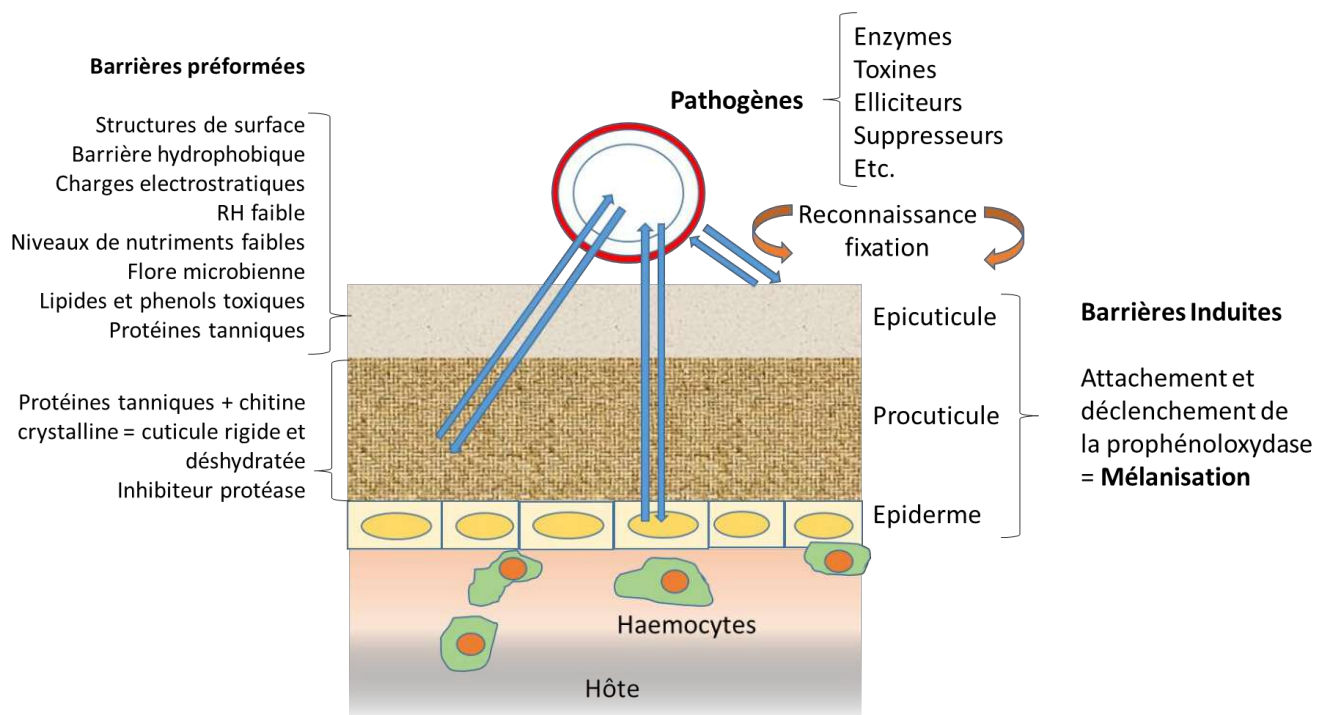


Figure 26 : Schéma du mécanisme infectieux illustrant les composantes majeures des interactions entre les insectes et les pathogènes durant la pénétration dans la cuticule. (Inspiré de St Leger 1993).

Après la phase d'adhésion, la **germination** est dépendante des conditions environnantes (Vega *et al.* 2009) et aussi de la physiologie de l'hôte, telle que la composition biochimique de la cuticule de l'hôte, qui peut favoriser ou inhiber la germination (Smith & Grula 1982, St Leger *et al.* 1989, Butt 1990, Butt & Becket 1994, Butt *et al.* 1995). L'avant dernière phase est la **différenciation** caractérisée par la production d'**appressorium**, structures terminales servant de point d'encrage, de ramollissement de la cuticule et à favoriser la **pénétration**.

C.2 La technique du Cheval de Troie

Là où le piégeage massif d'ouvrières ou de reproducteurs, principalement des reines, s'est révélé relativement inefficace sur le long terme chez les vespides invasifs, l'usage d'appâts empoisonnés, *i.e.* la technique du « Cheval de Troie », a quant à elle fait ses preuves (ex avec *V. vulgaris* et *V. germanica* en Nouvelle Zélande, plus de 99% d'efficacité [Beggs et al. 2011](#)).

La technique du Cheval de Troie est une méthode qui consiste à faire rentrer un perturbateur ou un parasite dans la colonie, *via* des ressources rapportées par les ouvrières à la colonie. Cette technique est classiquement utilisée pour lutter contre différents insectes sociaux (blattes, fourmis), en fournissant des appâts traités avec différentes molécules insecticides afin qu'ils soient ramenés puis distribués au groupe ou accumulés dans la colonie. L'usage de cette méthode de lutte a par exemple été conseillé pour la gestion de fourmis invasives *Pachycondyla chinensis* dans [Buczowski 2016](#). Les doses utilisées se doivent d'être non létales pour les ouvrières vectrices, afin qu'elles puissent avoir le temps de rapporter l'appât empoisonné jusqu'à leur colonie : on recherchera alors un effet d'accumulation dans le couvain. [Harris et al. 2011](#) ont envisagé l'utilisation de pathogènes d'insectes dans ce genre d'appâts contre des guêpes, afin de limiter l'impact environnemental de cette technique. En effet, dans le cas d'usage d'insecticides dans ce genre d'appâts, on risque d'assister à une accumulation de molécules toxiques en grande quantité dans un nid dont la localisation resterait inconnue. Le nid restant alors accessible à de nombreux autres organismes (oiseaux, mammifères, autres insectes) qui s'intoxiqueraient en mangeant ou en dégradant les individus traités, et des résidus se retrouvant alors dans l'environnement (eau, sol).

C'est pourquoi dans le but de développer une méthode de cheval de Troie à la fois efficace et écoresponsable, nous avons choisi de travailler sur différents micro agents de lutte biologique. L'impact potentiel des agents microbien de biocontrôle doit toutefois être évalué

rigoureusement, pour limiter les risques sur les organismes non-cibles, et optimiser leur mode d'application.

C.3 Recherche d'agents de biocontrôle pour agir contre *V. velutina*.

C.3.1 Présentation générale des agents de lutte étudiés

La **pathogénicité de l'inoculum** sporal, la **spécificité de l'hôte** et l'**origine** (natif, alien) sont des paramètres importants dans le choix d'un isolat fongique pouvant être utilisé en lutte biologique. Dans le cadre de la recherche d'agents de lutte biologique contre *V. velutina*, nous avons utilisé différents isolats natifs d'entomopathogènes appartenant à deux espèces très fréquemment utilisées en lutte biologique : *Beauveria bassiana* et *Metarhizium robertsii*. Nous avons travaillé avec des champignons présents dans des échantillons de sol, isolés sur des larves de l'eudémis de la vigne (*Lobesia botrana*) à l'automne 2015 dans des parcelles de vigne INRA (*Metarhizium*), et sur une souche isolée directement sur une reine de *V. velutina* en sortie d'hibernation au printemps 2016 en Bretagne (*Beauveria*). (Pour plus de détails, voir les Manuscrits 5 et 6)

C.3.2 Méthodes d'identification de souches d'entomopathogènes

C.3.2.1 Observations morphologiques

Dans un premier temps, une observation de l'insecte infecté doit être effectuée (Goettel & Inglis 1997): on observe la texture du mycélium, sa forme, sa couleur, puis la coloration des spores. Ensuite un montage de fragments fongiques entre lame et lamelle dans une goutte de bleu de méthylène permet d'observer les structures de sporulation de plus près (taille, forme des spores, forme des

hyphes). Grace à ces premières observations, on peut généralement obtenir l'identification de la famille du champignon (Wraight & Roberts 1987).

Les espèces de *B. bassiana* produisent des colonies avec un mycélium blanc cotonneux (Figure 27.A) très dense, et des spores transparentes. Les conidies ou spores (Figure 27.B) sont soutenues par de long filament en zigzag qui sont des hyphes transparents et septaux avec un diamètre de 2.5 à 25 µm. Les *M. robertsii* produisent des colonies avec un mycélium blanc poudreux et des spores vert olive plus ou moins sombres (Figures 27 C, D).

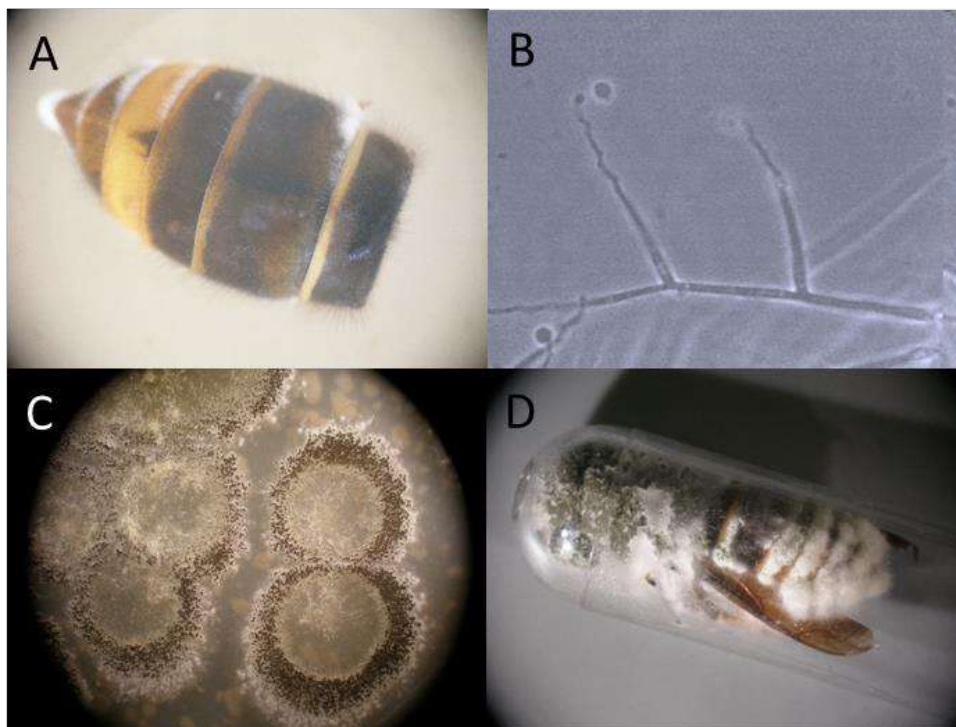


Figure 27 : A. Mycélium de *Beauveria bassiana* sortant d'entre les tergites de l'abdomen d'un *V. velutina* (loupe binoculaire X45). B. Hyphes de *B. bassiana* (Microscope) (photo de Kouassi 2001), C. Culture de *Metarhizium robertsii* sur gélose, les spores marron-vertes sont bien visibles. D. Frelon attaqué par des colonies de *M. robertsii*, le mycélium est blanc poudreux et les spores vertes olive. (Photos J. Poidatz).

C.3.2.2 Analyses génétiques

Comme indiqué précédemment, nous avons identifié un isolat de *B. bassiana* provenant d'une fondatrice de *V. velutina* capturée au printemps 2016 en Bretagne. Afin de valider l'identité du champignon proposée après sa description morphologique, nous avons réalisé une analyse génétique

Axe 3

([St Leger & Joshi 1997](#)), par PCR classique sur fragments TEF de son ADN. Ces parties d'ADN sont les plus intéressantes à observer pour une identification précise des souches isolées, et sont bien plus robustes que les ADN mitochondriaux pour identifier ces organismes ([Rehner *et al.* 2011](#)). Les analyses réalisées sont détaillées dans le manuscrit en cours de préparation [Manuscrit 5](#).

Manuscrit 5 (Shortnote): Further description of a strain of *Beauveria bassiana* naturally parasitizing the bee predator *Vespa velutina*.

Juliette Poidatz, Rodrigo Javier Lopez Plantey & Denis Thiéry

Manuscrit soumis à Journal of Invertebrate Pathology

Introduction

Insects can be parasitized by different fungus, belonging mainly to two genders: *Metarhizium* and *Beauveria*. These entomopathogenic fungi are characterized by a common infection mode, e.g. spore attachment to the insect cuticle (adherence and penetration ([Shahid et al. 2012](#))), penetration of the mycelium in the insect, fungus development, and after the host death, sporulation outside the host's body ([Meyling & Eilenberg 2007](#)). The pathogenicity of a fungus strain depends on different parameters (1) *host specificity*, some strains being more or less specified to some insect orders, (2) *growth speed*, (3) *lethality*, e.g. the probability to kill the host, and (4) *ultimate climatic conditions* (e.g. temperature, humidity). All these parameters are keys to describe pathogenic fungi.

The yellow legged hornet *Vespa velutina* is an invasive predator of bees accidentally introduced in France from East China in 2004 (see [Monceau et al. 2014](#) for a review). Since then, its expansion in Europe is quite consequent, this alien species being present in Portugal, Spain, Italy, and recently in 2016, England and Germany. This hornet is characterized by its strong predation on pollinators, especially honeybee, which it hunts in large amount ([Monceau et al. 2013a, b](#)). *V. velutina* enhances the stress level of the honeybee colony ([Tan et al. 2007](#)) and can sometimes directly cause its death, by predating honeybees, or indirectly, by decreasing the colony defences and resources for hibernation ([Matsuura 1988](#), [Monceau et al. 2014](#)). *V. velutina* lives in huge nests containing several thousands of individuals at the end of fall, and these colonies are often hard to find, because often hidden in tree canopies, bushes or buildings ([Monceau et al. 2014](#)). Mass trapping, direct hives protection with nests, entrance grids etc, foundresses trapping and nest destruction are the current control methods used to limit *V. velutina* impact on beehives, but these are costly, not efficient enough ([Monceau et al. 2012](#), [D. Decante pers. com. 2015](#)), and moreover, the products classically used for nest destruction

Axe 3

(insecticides powders, sulphur dioxide) are dangerous for both the environment and the applicator. More ecologic and safe control methods are needed in this situation. Biological control of invasive species with native organisms, which are well therefore adapted to their application environment (Vega *et al.* 2009), could be a good solution here. A few natural occurring organisms that attack *V. velutina* have already been described in France, being other insects (*Conops vesicularis* (Conopidae) (Darrouzet *et al.* 2015), and the nematode *Pheromermis vesparum* (Villemant *et al.* 2015) or viruses ((IAPV) Manley *et al.* (2015) and (DWV) (A. Dalmon *et al.* in prep). No application in biological control could however be yet envisaged with such species on *V. velutina*, because of low efficiency, and potential but not yet evaluated risks on non-target species and dispersion capacities or non-adapted development cycle (Beggs *et al.*, 2011; Monceau *et al.*, 2014; Villemant *et al.*, 2015). Entomopathogenic fungus could be very interesting to study and promising in this context, being more adapted to biological control programs (Butt *et al.* 2001).

Thirteen years after the introduction of *V. velutina* in France, the potential entomopathogenic fauna for this invasive hornet has not yet been studied, while we urgently need development different biological control methods. We describe here a native strain of *Beauveria bassiana* isolated from a queen of *V. velutina* caught in Bretagne that was found naturally parasitized. After a morphological and genetic description, we also described its growth in function of temperature.

Material and methods

- **Fungus isolation**

A foundress of *V. velutina* naturally parasitized by a fungus was captured in an alimentary trap at the end of May 2016 in Brest (Britannia, North-West France). The insect was externally disinfected by using paper towel imbibed with Calcium hypochlorite (50g/L). The insect was then cut in pieces, and the different parts were distributed amongst 3 Petri dishes on OAC medium ((Oat 40g, Agar (PDA, BK095HA, Biokar) 20g, Chloramphenicol (SIGMA Aldrich, Germany) 50mg, QSP 1L)), so the

fungus could grow. White mycelium began to emerge from the hornet cuticle's intersections (Figure 1).

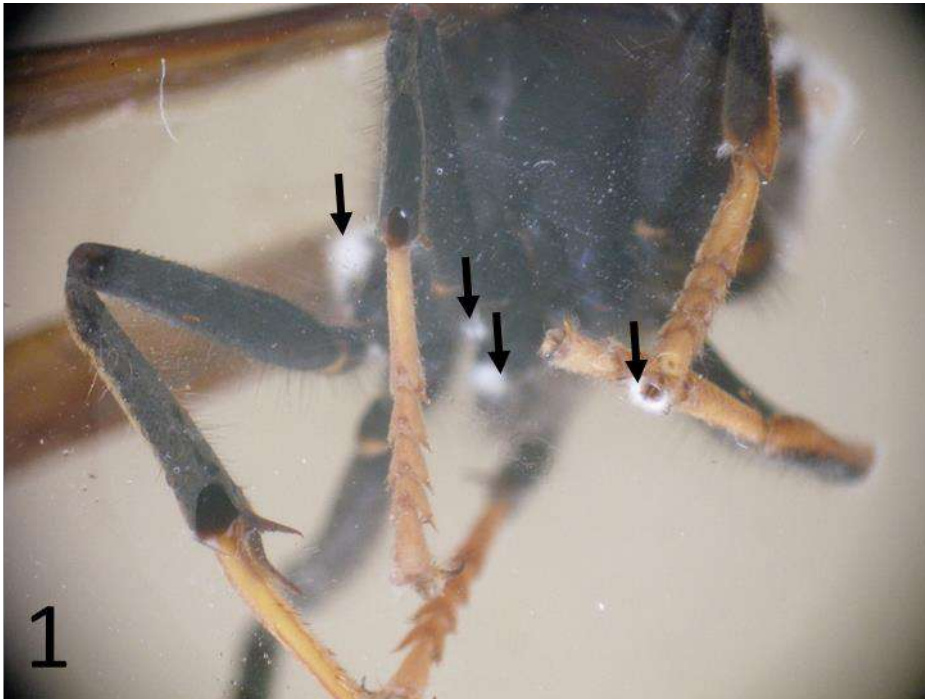


Figure 1. White mycelium of *B. bassiana*. emerging from the hornet's cuticles intersections in the thorax of the *V. velutina* queen (black arrows) (Pictures J. Poidatz).

The fungus was then purified by multi-passaging on OAC media (Oat 40g, Agar (PDA, BK095HA, Biokar) 20g, Chloramphenicol (SIGMA Aldrich, Germany) 50mg, QSP 1L) for two months. The fungus was then put in culture on top of cellophane paper on OAC medium Petri dishes, so the mycelium could be easily extracted by gently scraping the surface of the cellophane for DNA extraction.

- **Macroscopic description** (Figure 2 A).

- The Colony shape is regular round, colony aspect is white cottony compact; colony edges are well-defined; and conidia are colorless.

Axe 3

- **Microscopic observation**

A fungus preparation colored by methylene blue was obtained on a microscopic lamella, then we observed the fungus structure (x40) to make a further diagnostic of the species (Figure 2 B). Under microscope we found conidiophores as sympodulospores (conidia positioned in zig-zag).

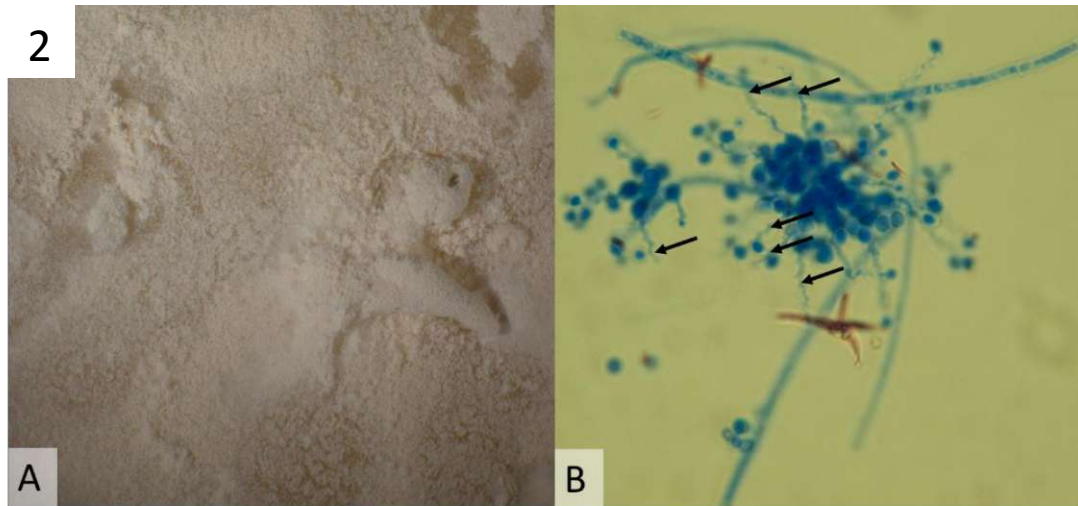


Figure 2. A. *Beauveria bassiana* mycelium growing on agar (x1.5). (Picture J. Poidatz). B. Microscopic observation of the *B. bassiana* structures colored with Methylene blue. The black arrows indicate the position of the conidiophores as sympodulospores (x1500) (Picture R. Lopez Plantey).

- **Genetic analysis**

After the lyophilisation of the mycelium samples (12h), their DNA was extracted using the technique described by Zolan & Pukkila (1986) without Proteinase K. We concentrated the DNA at two different concentrations for the PCR: 20 and 50µL/ml. Thanks to macro and microscopic observations, we had a strong presumption on the fungi to be *Beauveria sp.* Therefore, we chose the primers TEF-exon 983F and 2218R for the fungi DNA amplification (Rehner et al. 2011).

We used 0.2µL of primer 938F and 0.2µL of 2218R, with 0.2µL of dNTPs, 1.5µL of PCR Buffer 10x, 0.45µL of MgCl₂, 11.31µL milliQ water, 0.04µL of Taq and 1.1µL of DNA. A PCR Touchdown was made (Rehner et al. 2011), i.e. with a diminution of 1°C in each 9 first cycles. The PCR products were validated by an electrophoresis migration (Agarose 2%).

Axe 3

Forward and reverse DNA sequencing were made by the company Genewiz (Takeley, Essex CM22 6TA United Kingdom). The sequences were analysed by using the Software Mega7® with the option alignment muscles. We then built a Maximum Likelihood Tree with Mega7®.

- **Koch Postulate validation**

After isolation of the fungi from the different parts of the infected foundress we inoculated the fungus to 15 workers of *V. velutina* during the summer 2016, by immersion of each worker <1 second in a 10⁷ spores/ml suspension. The survival over time of the infected hornets was assessed daily for one week. As hornet are social insect and cannot survive alone very long, the inoculated individuals were maintained in group of five in 10cm diameter Petri dishes in a climatic chamber at 23°C±1°C, 12h/12 Lum. To confirm the cause of death, once dead, individuals were put in an haemolysis tube closed with a humid cotton copper: we checked for fungus growth on these individuals every day during 15 days,

- **Mycelium growth**

We collected fungus plugs from similar age areas of the mycelium, and placed them in the centre of new Petri dishes on an MAC culture medium (Malt + Agar (PDA, BK095HA, Biokar) (2%) + Chloramphenicol (SIGMA Aldrich, Germany). This culture medium being transparent, the accurate observation of growing mycelium was possible. For each temperature, ten replicates were done. The growth of the fungus was measured once each day for 16 days after inoculation, by taking pictures of the Petri dishes. We thus assessed the mycelium area through Image analysis using ImageJ v1.5 software. We then calculated the AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) for each temperature and each replicate as described in [Campbel & Madden \(1990\)](#) using the R package “agricolae”. After verifying for data normality by doing a Shapiro test, we made an ANOVA and then a Tuckey HSD test for comparing each growing modality.

Results

• Morphological and genetic description

The typical white mycelium indicated that this fungus was a *Beauveria* sp. Under microscope, we observed the conidiophore with sympodulospores (conidia positioned in zig-zag) and small round transparent spores (Fig 2b), so we supposed this fungus was included in the taxonomic gender of *Beauveria*.

The DNA migration on agarose of the PCR products revealed strong signals for the 50ng/μL DNA concentrated products, but at 20 ng/μL the signals were very light, therefore we choose to genotype only the first. After sequencing and sequence cleaning, the results of the muscle alignments are illustrated in the tree Figure 3. The fungi match at 100% with other *B. bassiana* strains, confirming previous observations (Table 1).

Table 1: Genetic proximity of the TEF 1α fragments analyzed with other *B. bassiana* strains.

GENBAN K	SPECIES	AUTHORS	JOURNAL / INSTITUTION
HQ881006	<i>B. amorpha</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
HQ880994	<i>B. australis</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
JQ867149	<i>B. bassiana</i>	Cai, Y. & Huang, B.	Anhui Provincial Key Laboratory, Anhui Agr. Univer., China (2012)
HQ880974	<i>B. bassiana</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
HQ880976	<i>B. brongniartii</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
JN689371	<i>B. lii</i>	Zhang, S.L. <i>et al.</i>	Mycotaxon 121, 199-206 (2012)
HQ881002	<i>B. varroae</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
HQ881020	<i>Cordyceps militaris</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)

Axe 3

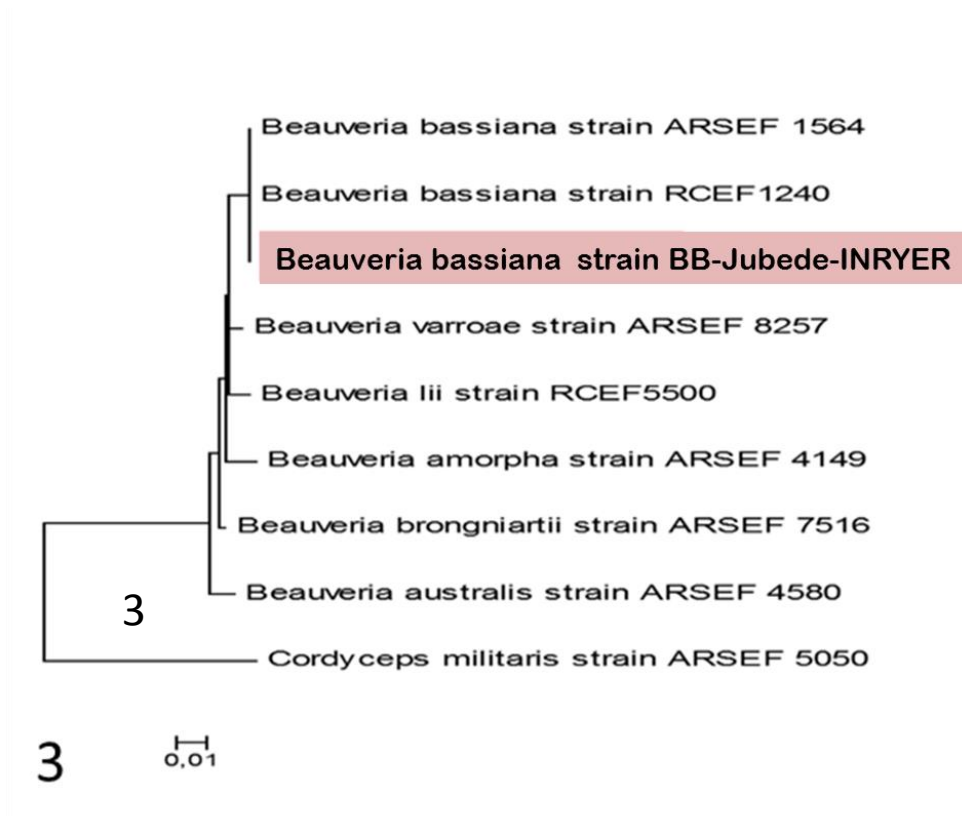


Figure 3. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method and “muscle” alignment method. The strain described here, BB-Jubede-INRYER, is on the same bar than the other *B. bassiana*, what means that they are 100% identical. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model [1] (10 000 rep, cut off (60%)). The tree with the highest log likelihood is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 9 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 907 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [2].

The Koch postulate was here successfully validated by succeed in reproducing the symptoms of the initial infected foundress of *V. velutina* on 10 of the 15 infected *V. velutina* workers.

Axe 3

- **Fungal growth in function of temperature**

For the temperature 12°C, one Petri dish was found contaminated by mites and was then not kept in the analysis.

The *B. bassiana* strain growth was faster between 20 and 28°C (Figure 4), and significantly slower between 12 and 16°C. The growing at 28°C and at room temperature were very variable. The ultimate temperatures seemed to be positioned between 20°C and 22°C.

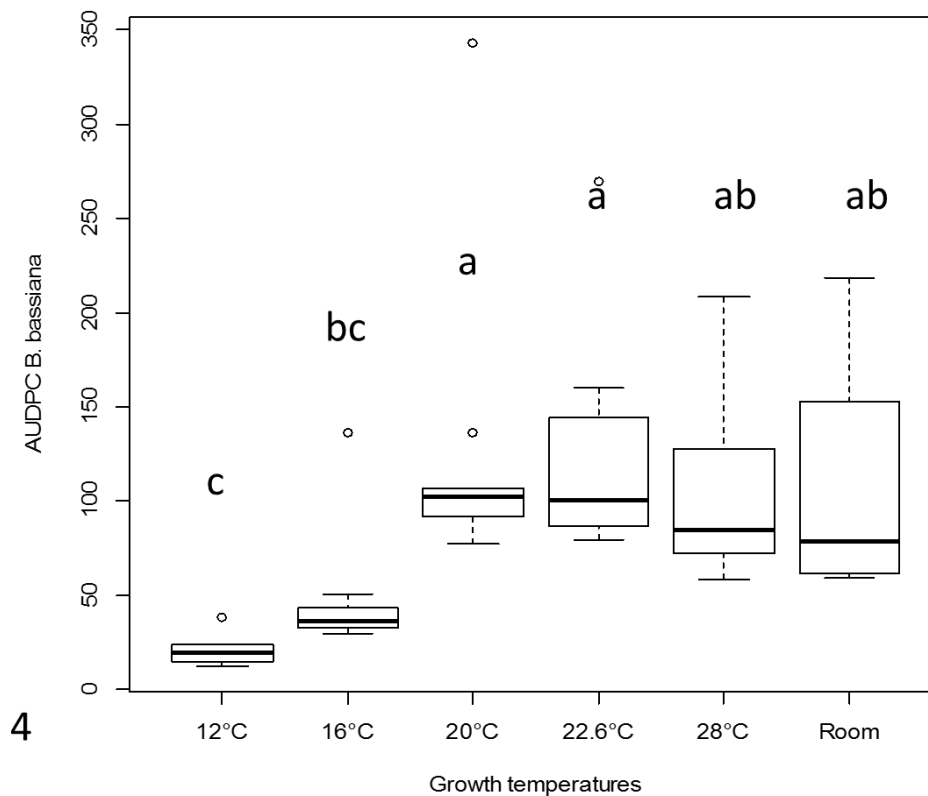


Figure 4. Evolution of the AUDPC (Area Under Disease Progress Curve, Campbell & Madden (1990)) of the *B. bassiana* strain given the temperature.

Discussion

This is the first time that a native pathogen naturally parasitizing the invasive yellow legged hornet *V. velutina* is described. The infected foundress found in Britain probably contaminated itself

Axe 3

during its hibernation diapause in ground or wood, or maybe during wood pulp collection for its nest construction, such pathogen's spores being present naturally in soil and wood for conservation (Meyling & Eilenberg 2007). The strain described here seems to be more adapted to intermediate temperature than fresh ones, what seems logical given that it was found in an oceanic temperate climate. The application of this strain for treatments using various methods (see Poidatz *et al.* Submitted to JIP), shall better take place when the temperatures are higher than 20°C for a better fungus installation and dispersion.

Entomopathogenic fungus could be used to control *V. velutina* by several ways, once the suitable mode of application has been screened out by several assays. First, we have observed a good capacity of the spores of this fungus in liquid suspension to infect adults of *V. velutina*, such suspensions could thus be sprayed on/inside the nests. As shown in Poidatz *et al.* (submitted to the journal) infection of workers through a short passage in an aqueous spore suspension should be promoted. Second, the potential of this strain to be used as a “Trojan horse” control agent should be evaluated: meaning the parasite is hidden in an attractive and selective bait before being brought back to the colony by the workers. Distribution of spores amongst colony members and germination of these spores could lead to high mortality inside the nest and to its collapse (Rose *et al.* 1999). To do so, one need to evaluate the potential impact of this strain on hornet larvae and their development (Rose *et al.* 1999), but we also have to be sure that its odour is non-repulsive for workers (Mburu *et al.* 2013) if used in baits.

In order to develop a control method based on such entomopathogenic fungi strains, the foraging behaviour of early infected workers should be investigated to evaluate the potential dissemination of the spores to the preys (e.g. honeybees, bumble bees) and in the environment (Baverstock *et al.* 2010). Analysis of activity rhythm and foraging tracks durations by different tracking techniques or actographic techniques could thus be very instructive for this purpose. An improvement of the potential of this strain as a control method for *V. velutina* could be done through its formulation, by making the spore more persistent, virulent or less sensitive to UV radiations (Borges 1998, Fernandes *et al.* 2015, Inglis *et al.* 1995).

Author Contributions statement

JP, RLP and DT conceived the ideas and designed methodology. JP isolated the *Beauveria*. JP collected the data; JP and RLP analyzed the data; JP, DT and RLP wrote the manuscript.

Acknowledgements

This work was done during the PhD thesis of the first and the second author. We thank Leslie Daraigne for making the PCR. We thank Olivier Bonnard for helping us capture the hornets used in the experiment. We thank Jessica Wallance (UMR 1065 SAVE, BSA) for her advices on PCR analysis. We thank Bayer Crop Science, represented by Bénédicte Laborie, for the first author financial support. The *Beauveria bassiana* strain was deposited at the CNCM (Pasteur Institute), under the reference BB-Jubede-INRYER, with the registration code CNCM I-5254.

Conflicting interest.

The authors declare no conflicting interest in this research

C.4 Evaluation de l'efficacité de certains isolats d'entomopathogènes généralistes sur *V. velutina*

C.4.1 Biocontrôle d'adultes de *V. velutina*

Afin d'évaluer l'efficacité potentielle des souches d'entomopathogènes isolées comme agents de biocontrôle de *V. velutina*, des bio-essais ont été mis en place dans un premier temps sur des ouvrières, entre 2015 et 2016. Généralement, les articles publiés présentent leurs résultats fondés sur une technique d'inoculation : immersion dans une solution de spores, ou pulvérisation aérosol de la solution de spores (Goettel & Inglis 1997). Mais nous avons choisi dans notre étude de tester plusieurs méthodes d'application mimant les différents mécanismes de contamination des frelons asiatiques suite à un traitement. Cette approche avait déjà été celle de Harris *et al.* 2000 sur *V. vulgaris*. En plus du traitement direct par immersion où les adultes sont trempés quelques secondes dans une solution de spores, nous avons testé un traitement de contact (*i.e.* par contact entre l'adulte et une surface contaminée sèche), dans de la nourriture (dans notre expérience nous avons mis du poisson), et par transfert entre individus (un individu contaminé par groupe de cinq). Nous avons utilisé deux critères classiques d'évaluation des souches d'entomopathogènes: **la LT50** *i.e.* le temps mesuré *a posteriori* nécessaire pour tuer 50% des individus exposés, et la **létalement**, correspondant au pourcentage de morts par infection par le champignon après une semaine. Pour valider le fait que les morts étaient bien dues à une attaque de l'entomopathogène, les individus morts ont été isolés dans des tubes à hémolyse tous les jours, et leur état était surveillé: l'apparition du mycélium de l'entomopathogène entre les plaques chitineuses de l'insecte permettait de confirmer l'infection. Pour rappel, un entomopathogène n'est pas saprophyte, *i.e.* il n'infecte donc pas un hôte déjà mort.

Manuscrit 6: Indigenous strains of Beauveria and Metarhizium as potential biological control agents against the invasive hornet Vespa velutina

Juliette Poidatz, Rodrigo López Plantey, Denis Thiéry

Soumis à *Journal of Invertebrate Pathology* (juin 2017), minor revisions requested

Abstract

Alien species often miss parasites in their invaded area, and this is the case in *Vespa velutina*. This invasive hornet predator of bees was accidentally introduced in Europe from East China in 2004. The control of this species is still problematic, because it's too costly or dangerous for the applicator. Studying the potential interest of biological control methods may help to propose alternatives in *V. velutina* control. We present here bioassays in which we assessed the potential control efficiency of different French isolates of entomopathogenic fungi that we inoculated to adults of *V. velutina* by different ways, being direct inoculation, contact on a contaminated surface, contaminated food, or by inter-individual transfers. We tested differences between the isolates and the application methods using two parameters being lethality and aggressiveness. The direct inoculation method was the most efficient modality, then the contact, transfer and food. Considering all contamination methods, there was no differences in the LT50 or lethality between the different isolates. Still the aggressiveness was quite short in all isolates (average 5.8 ± 0.44 days), and their efficiency is quite high: we conclude that there is high potential in using such entomopathogens as a biological control agent against *V. velutina*, first at least to replace currently occurring direct chemical treatments, and then potentially to be integrated in future Trojan horse strategies .

Keywords: Asian hornet, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii*, biological control.

Introduction

During the invasion process, alien species often miss parasites in their invaded area, because of reduced probability of their transport with the host and the unsuitability (climatic or biologic) of the invaded area for those parasites (Torchin *et al.* 2003). This reduced parasitism allow them, the alien species, to expand quickly and reach high population levels, which often results in damages (Torchin *et al.* 2002). Social insects are particularly good invaders, thanks to the adaptability provided by their life in society (Moller 1996). Social insects are characterized by their group integration, the division of labor and the generation overlap; these characteristics are in favor of multiplied interactions, in particular in their nests. Indeed, members of the colony have to supply the nest with food, water and construction material foraged in the outside (Spradbery 1973, Raveret Richter 2000), and this enhances contamination transmissions risks. Some ants developed prophylactic strategies to limit this risk (reviewed in Cremer *et al.* 2007), like an ultra-specialization of the tasks to limit the interactions between extra and intra colony individuals, and limit direct queen and court interactions with the outside (Ugelvig & Cremer 2007). For some bees, the use of chemicals to disinfect the colony structure from mandibular glands has been demonstrated (Cane *et al.* 1983), while for ants the use of formic acid is more favored (Stow & Beattie 2008). However, the sociality level of Vespids is lower than for these bees or ants, the colonies being much smaller and less complex (Jeanson *et al.* 2007), and they might thus be more susceptible to infections.

Vespa velutina var. *nigrithorax* (Lepelletier, 1835) (Hymenopteran: Vespidae), native from East Asia, is an invasive predator of arthropods that was accidentally introduced in France around 2004 (Monceau *et al.* 2013b, 2014a, Arca 2015). Since then, the “yellow legged hornet” spread in Europe: Spain (López *et al.* 2011), Portugal (Grosso-Silva & Maia 2012, Bessa *et al.* 2016), Italy (Porporato *et al.* 2014), Germany (Rome *et al.* 2015), Belgium (Rome *et al.* 2013), recently in England (2016) and in Scotland (March 2017) (reviewed in Monceau & Thiéry 2017). This species is a very efficient predator of pollinators, especially of honeybees, thus impacting both the apiculture and the global biodiversity directly and indirectly (Matsuura 1988, Tan *et al.* 2007, Monceau *et al.* 2014a). V.

Axe 3

velutina has an annual development cycle: a foundress initiates the nest in spring, the colony grows until the end of autumn when the new sexed (males and gynes) are produced. The colonies reach easily 4 000 individuals at this stage, and an estimation of the global population produced annually by a nest can reach 15 000 individuals (Rome *et al.* 2015). The nest is papier-mâché made, by mixing plant fibres with water and saliva (Spradbery 1973), closed, with one unique enter hole in its side. The nests are located mostly in open spaces (trees, brushes, under frames), and more rarely in closed places like roofs, holes *etc* (reviewed in Monceau *et al.* 2014a). The density of nests in invaded area can be impressive given the observed area (Monceau & Thiéry 2017), and their destruction implies specific equipment and qualified people. The methods that are currently used to limit the impact of *V. velutina* are a) trapping (for now nutrition-traps), in spring for foundresses, and in summer-autumn for apiaries protection by capturing hunters, b) physically protecting the apiaries by using nests, grills, and c) nest destruction, using chemical insecticides (powders or liquids) or Sulphur dioxide (gas). A significant impact of traps on non-target insects was already demonstrated as well as their inefficiency (Beggs *et al.* 2011, Monceau *et al.* 2012, Monceau *et al.* 2013c). The direct nest destruction methods by insecticide or gaseous Sulphur injection in the nest are efficient, but can have side effects on the environment if the nests are left in place after chemical treatment (food chain), and also for the applicator, with irritations and respiratory problems (H. Guisnel, personal communication). Nevertheless, whatever the technique of nest control, locating the nests early in season, *i.e.* before predation on hives, remains the major unsolved limit, the colonies being discrete, numerous, often not accessible and well-hidden mostly in the trees foliage (Monceau *et al.* 2014a).

Biological control is a long known method where organisms control pests by predation or parasitism (Lacey *et al.* 2015). *V. velutina* is parasitized by the tachinid fly *Xenos Moutoni* (Dipteran) in Korea (Makino *et al.* 2011); in France, the endoparasitoid *Conops vesicularis* (Conopidae) (Darrouzet *et al.* 2015), and the nematode *Pheromermis vesparum* (Villemant *et al.* 2015) were found parasitizing *V. velutina*. According to Manley *et al.* (2015) the Israeli acute paralysis virus (IAPV) can affect *V. velutina*, but also the Deformed Wings Virus (DWV) (A. Dalmon *et al.* in prep). No application in biological control could however be yet envisaged with these species on *V. velutina*, because of low

Axe 3

efficiency, not yet evaluated risks on non-target species and dispersion capacities or non-adapted development cycle (Beggs *et al.* 2011, Monceau *et al.* 2014a, Villemant *et al.* 2015).

The possibility to use entomopathogenic fungi as an alternative method to the control with synthetic products has taken on some importance, emphasizing that practically all orders of the Insecta class are susceptible to be affected by entomopathogenic fungi (Alean 2003, Rehner 2005). The main properties attributed to the use of entomopathogenic fungi are: strong specificity between pathogen-host, almost no presence of toxic residues, persistence in time after application, a lower cost than synthesis products, but also a high potential as a source of metabolites for the creation of alternative phytosanitary products (toxins for example), etc... (Franco *et al.* 2012).

Among the diversity of entomopathogenic fungi, the literature cites two genders as the most described and used in biological control: *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp. (both Ascomycota: Hypocreales) (Bidochka *et al.* 1998, Bidochka & Small 2005, Rehner 2005). Both genders can have host specificity given the isolates and climatic conditions (Ignoffo 1992, Rangel *et al.* 2015). The infection mechanism is quite similar in these two fungi, being first a phase of recognition and fixation of the spore to the insect host, its penetration in the insect tegument, then the evasion of the host immune defenses, the proliferation in the host body (provoking the host death), and finally the reemergence from the host and sporulation (Boucias & Pendland 1991, Bidochka & Small 2005, Ortiz-Urquiza & Keyhani 2013).

Isolates of *Metarhizium* are already on the market for biological control of pests, mostly lepidopteran and dipteran control (Annexe 1). *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. has yet no host specificity connected to genetic described in the European clade (Rehner 2005).

A few studies on hymenopterans biocontrol by fungus exist: on micro-hymenopterans (Lord, 2001 (Bethyridae), Potrich *et al.* 2009 (Trichogrammatidae), Rossoni *et al.* 2014 (Braconidae), Agüero & Neves 2014 (Scelionidae), Kpindou *et al.* 2007 (Encyrtidae)), ants (Jaccoud *et al.* 1999, Tragust 2013, Loreto & Hughes 2016), and bees (most of the time for varroa treatment (Kanga *et al.* 2003, García-Fernández *et al.* 2008), or susceptibility (Conceição *et al.* 2014)); also Rose *et al.* 1999 and Harris *et*

Axe 3

al. (2000) explored the potential control of such generalist entomopathogens on an invasive Vespidae, *V. vulgaris* (Vespidae), in New-Zealand.

Thirteen years after the introduction of *V. velutina* in France, the potential entomopathogenic fauna for this invasive hornet has not yet been studied, while we urgently need development of different biological control methods. This study aims to provide knowledge that could contribute to enlarge the panel of tools that can be used to control directly or indirectly the Asian hornet and limit its impact on bees, and also to reduce the risks on applicators.

The risks of contamination by infectious agents are significant in social insects and thus in hornets: they can be in contact with fungus in different ways, which inspired the modalities of inoculations and transfers of spores for us to complete this study: by direct contact with spores (rain, water), by walking on contaminated surfaces (ground, trees, preys, etc.), by eating contaminated food, and by trophallaxis or grooming with a contaminated individual from its colony. In this study we assessed the potential control efficiency of different French isolates of entomopathogenic fungi that we inoculated to *V. velutina* by these different ways.

Material and methods

Insects collection

We collected individuals of *V. velutina* workers hunting in front of hives and in untreated nests. Before the experiment, the insects were maintained in groups in meshed boxes (10 x 20 x 10 cm) inside a climatic chamber at 23°C±1°C, 12h/12h light. They had *ad libidum* access to water and honey like in previous studies (Poidatz *et al.* 2017).

Fungus collection and multiplication

In the spring of 2015 a composite sampling of the first layer of the soil (20 cm) was made in the interrows of our experimental INRA vineyard (Villenave-d'Ornon, South West of France, 44°11'47"30.4"N 0°34'36.9"W). This sampling consisted in the collection of 4 sub-samples per

Axe 3

hectare, which were sieved up to 45 mesh and preserved at 4° C until use (Quesada-Moraga *et al.* 2007, Marques 2012). A total of 20 sub-samples were collected for a surface of 5 hectares.

Afterwards, the bait insect technique (Asensio *et al.* 2003, Meyling 2007, Tuininga *et al.* 2009) was carried out using L4 and L5 larvae instar of *Lobesia botrana* (Denis and Shiffenmüller) (Lepidoptera: Tortricidae) which were placed in groups of 5 in Petri dishes with soil samples (3 replicates per one soil sample). The larvae were from the INRA laboratory colony isolate reared on artificial medium as described in Thiéry & Moreau (2005) (22°C, 60%HR, 16:8 lum.). The Petri dishes were placed at controlled temperature, humidity and photoperiod (24°C, > 60% RH and 16:8). The dishes were observed daily and the individuals who manifested symptoms were transferred to a humid chamber in order to favor the development and possible fructification of the entomopathogenic fungi. By this technique were obtained the isolates of *Metarhizium robertsii* EF2.5 (2), EF3.5 (1), EF3.5 (2) and EF3.5 (4). The growing and multiplication of all the fungi took place in Petri dishes with OAC media (Oat 40g, Agar (PDA, BK095HA, Biokar) 20g, Chloramphenicol (SIGMA Aldrich, Germany) 50mg, QSP 1L) (Cañedo & Ames 2004, Moino *et al.* 2011, Marques 2012) (darkness, room temperature).

The isolate of *Beauveria bassiana* BB came from Bretagne (North West of France). It was found directly in a foundress of *V. velutina* in spring 2016 (Poidatz *et al.* in prep). After a rapid cleaning of the extern cuticle of the infected individual using a hypochlorite bath of 10 seconds, we cut the hornet in 3 parts that we placed in different Petri dishes on growing media OAC as described before. All isolates were purified by multi-passaging, *i.e.* multiple subculture of the fungi in Petri dishes for minimum 5 generations.

Inoculation methods

For assessing the potential control efficiency of the different isolates, we did different inoculation methods: **direct inoculation**, by contact with a **contaminated surface**, in the **food**, or **inter-individual transfer** (Fig 1).

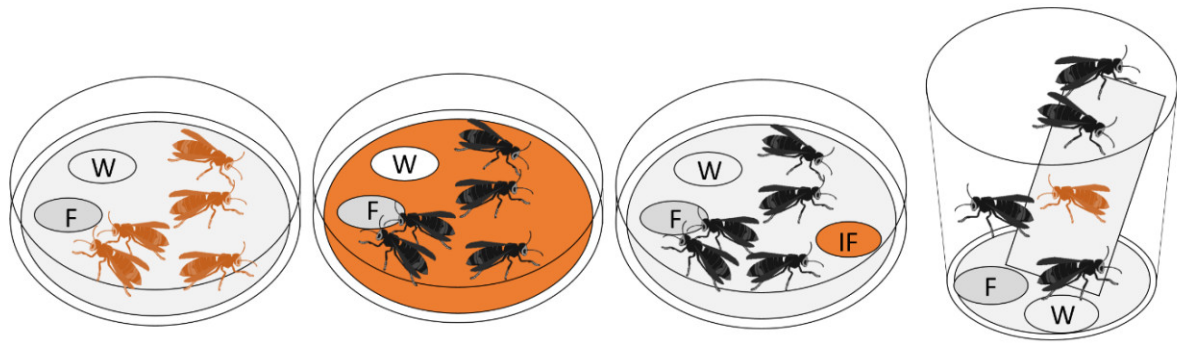


Figure 1: The different treatments used in the experimentation. From left to right: direct contamination of the hornets (orange), contaminated filter paper, contaminated food (IF, orange), and one contaminated individual (orange) with four uncontaminated individuals. In each box there are food (F) and water (W).

All the petri dishes roofs were pierced with a thin needle for aeration (15 holes) a day before the experiment. The day of the experiment, maximum two hours before application, the spore suspensions were prepared under sterile conditions, and fixed at a concentration around 10^7 spores/ml. The control was distilled water. As we treated very quickly the hornets after making the spore suspension, we didn't add any solvent in the suspension. For the control hornets in each modality, we used distilled water instead of spore suspension.

The hornets were cooled 20 min in falcon tubes that were put in ice, so they can be manageable during the fungus inoculation. The hornet workers don't survive very long when they were isolated (personal observation), probably because of social grooming lacks. We thus decided to leave them in groups after inoculation. For the three first treatment methods, the hornets were put in groups of five in each Petri dishes of 10cm diameter, that contained a thick filter paper on the ground, a cup with water in cotton, and a cup with food (candy sugar (glucose, fructose and saccharose) purchased by ®NutriBee propolis (Vétopharma)). For the fourth treatment method, c.a. contamination by transfer, we chose bigger pots (plastic honey pots, 9cm diam x 10 cm diam x 12 cm high) with a strip of embossed paper allowing the hornets to climb on it thus to avoid forced contacts. After placing the hornets in the different arenas, we waited 5-10 minutes for all the hornets to wake up, and we removed and replaced dead individuals due to temperature shock or to drowning.

Axe 3

After inoculation, the boxes containing the hornets contaminated by the different modalities were all placed in a climatic chamber at $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, photoperiod of 12h..

Four repetitions of the bioassay were made: in October 2015 (10 individuals / modalities (*Metarhizium* r. 4 isolates, Control x 4 inoculation methods); N=2, Nb individuals=200), in August 2016 (10 individuals / modalities (all 5 isolates + control x 4 inoculation methods); N=2, Nb individuals=240), the same in September 2016 (N=2, Nb individuals=240) and in October 2016 (N=2, Nb individuals=240).

- **Direct contamination**

The hornets were contaminated by immersion (<1sec) in a spore suspension. The forceps used to manipulate the hornets for this method were first disinfected with ethanol (90%) then washed with water before switching from one isolate to another.

- **Contamination by contact**

In this modality, 3ml of spore suspension was poured uniformly on the filter paper in the Petri dish using a pipette. The paper dried five minutes before the candy, the water and the hornets were put inside the box.

- **Contaminated food**

In this modality, 1ml of spore's solution was poured in 10mg of cooked tuna (from the market). The fish was left in the boxes only 24h to avoid hornet intoxication by potential bacterial development.

- **Inter hornets contamination, transfer**

Four hornets were placed in a pot as described above in 1.3. One extra individual was directly contaminated as described in "direct contamination" paragraph, then placed on the opposite side of the box from the other hornets before reanimation.

Axe 3

Measured parameters

- Mortality Index (MI)

Each day after the inoculation, we removed the dead hornets from the different boxes and placed them individually in labeled hemolysis tubes closed by a cotton copper. We maintained the humidity of the tubes by adding distilled water in the copper using a pipette.

The isolated dead individuals were then observed each day for the fungus to emerge from the cuticle's intersections (Figures 2.A, 2.B). The death of the hornets could be due to multiple factors (Figures 2.C, 2.D, or bacterial infection, stress, etc.).

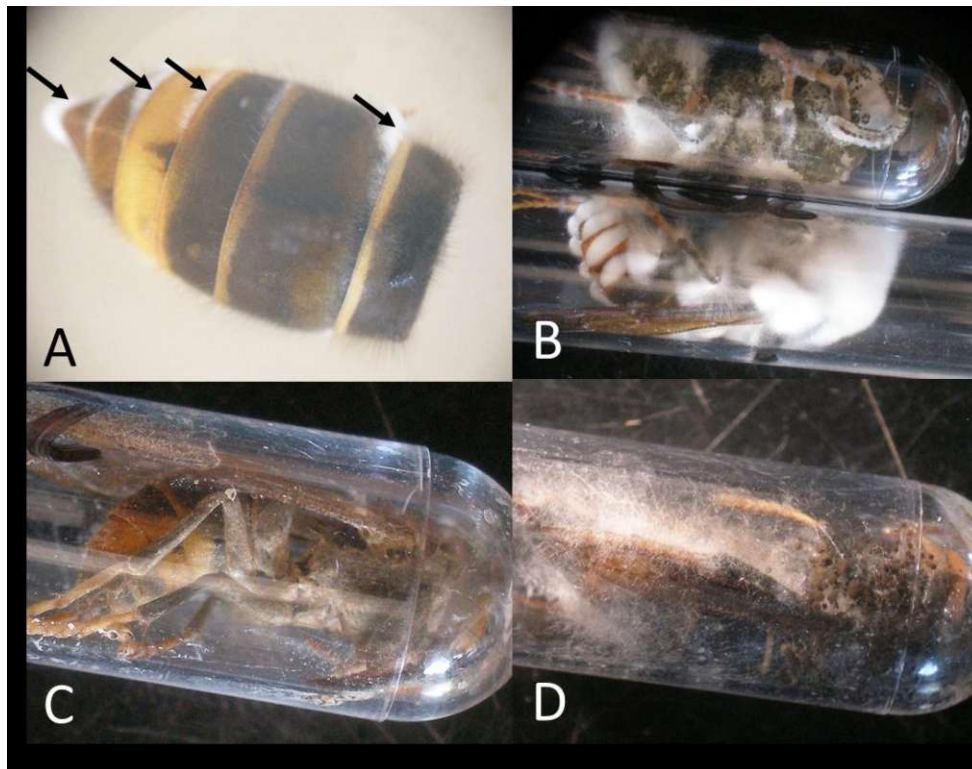


Figure 2: *V. velutina* workers infected by entomopathogens. A. An entomopathogenic fungus is making its way between the cuticle's segments of the abdomen of a hornet. B. Two contaminated hornets by *Metarhizium robertsii* (white mycelium, olive green spores)(top) and *Beauveria bassiana* sp. (white mycelium, transparent spores)(bottom). C & D. Dead hornets with opportunistic saprophytic fungus growing on their surface (*Penicillium* sp. (C), *Aspergillus* sp. (D)).

Each death caused by entomo-pathogen infection was then reported, to correct the number of dead by treatment and obtain the number of dead by entomo-pathogenic infection per treatment.

Axe 3

$$MI = \frac{\text{Control alive larva} - \text{Treatment alive larva}}{\text{Control alive larva}}$$

- *LT50 measurement*

The LT50 is the moment after inoculation when 50% of the hornets died by infection.

Statistical analysis

All results have been analyzed in ANOVA with a test LSD Fisher (alpha= 0,05) using the software Infostat update 2016.

Results

No death of hornets due to entomopathogenic fungi was recorded in the control.

Comparisons of the inoculation methods

For all the isolates, the most efficient modality concerning lethality was the direct inoculation, statistically more efficient than all inoculation modalities. The contact method was not different from the transfer method, and the transfer method was not different from the food method. This last treatment (food) is different from the contact modality (LSD Fisher test) (Table 1).

Table 1: Average lethality and compared lethality in function of inoculation methods. Values with the same letter are not significantly different ($p > 0,05$) after parametric LSD Fisher test (alpha= 0,05; DMS= 0,12264; Error: 0,0746; gl: 151).

TREATMENT	AVERAGE	N	E.E		
<i>Food</i>	0.14	38	0.04	A	
<i>Transfer</i>	0.26	38	0.04	A	B
<i>Contact</i>	0.35	38	0.04		B
<i>Direct</i>	0.60	41	0.04		C

Axe 3

No significant difference was observed between the different isolates and fungi in their aggressiveness (ANOVA).

Comparison of the isolates

- *Lethality.*

Considering all the inoculation methods, no difference could be found amongst the isolates virulence (ANOVA, $p = 0.31$). No difference could be found amongst the isolates for the direct inoculation method (ANOVA, $p = 0.14$), neither for the contact (ANOVA, $p = 0.24$) nor the transfer (ANOVA, $p = 0.47$) inoculation method. However, for the food inoculation method there was a difference (ANOVA, $p = 0.009$): the isolate EF3.5(2) was significantly more efficient (LSD Fisher test).

- *Lethal Time LT50.*

Table 2: LT50 *i.e.* time to kill 50% of the hornets, and average incubation period of the entomopathogens isolates, in function of the inoculation methods.

ISOLATE	M $\pm$ SD (DAYS)	LT50 (DAYS)
EF2.5(2)	5,68 $\pm$ 1,08	6
EF3.5(1)	5,86 $\pm$ 1,17	6
EF3.5(2)	5,49 $\pm$ 1,38	5
EF3.5(3)	5,41 $\pm$ 1,18	6
B	6,25 $\pm$ 0,67	6

No significant difference was observed between the different isolates and fungi in their LT50 (Table 2).

Axe 3

Comparisons of each method for each isolate

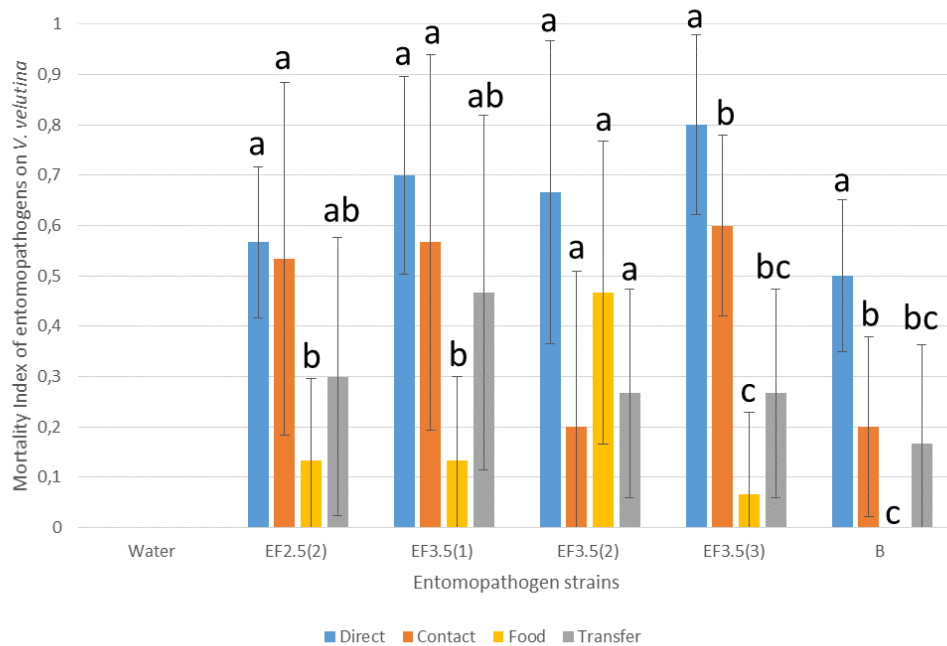


Figure 3: Lethality of entomopathogens isolates in function of the inoculation methods, *i.e.* percentage of dead hornets by entomopathogen infection (ANOVA tests).

For all strains the direct application method was the most efficient, and except in EF3.5(2), the contact method appeared to be also interesting. In EF2.5(2) and EF3.5(1) the transfer between individuals was also quite efficient, when in EF3.5(2) no differences between inoculation method could be assessed. No significant difference was observed between the different application methods in function of isolates and fungi in their LT50 (ANOVA).

Discussion

This study may offer at least two issues, first in the theoretical knowledge on the entomopathogenic mode of action of fungi on *Vespa* species, and second on the perspective of future application to control *V. velutina* populations. We here highlighted different entomopathogenic fungi that could

Axe 3

potentially be developed for *Vespa* control, and we assessed their efficiency with different inoculation modalities.

The reduction of adult hornet longevity by the application of the different isolates observed in the study is coherent with the study of [Harris et al. 2000](#) on the same type of pathogens (2.1 to 5.6 days). The quite high variability in the mortality intra/inter sessions could be explained here by the fact that the hornets used in this study to be contaminated were savage individuals collected in the wild, with unknown variation in their age, past, and therefore in their immune system and sensitivity to infection ([Franceschi et al. 2000](#), [Moret & Schmid-Hempel 2000](#), [Rolf 2001](#), [Doums et al. 2002](#)). In the direct contamination treatment we observed the cumulated effect of both direct contamination **and** transfer between the adults.

The applied possibilities of these biocontrol methods of inoculation are numerous, but given our results, the one that seems best suited for *V. velutina* control is direct application of spore solutions on and in the hornet colony. Indeed, a direct treatment of nests could cumulate the effects of the “direct”, the “contact” and the “transfer” application modalities. Tests on nests have to be made to assess the isolates efficiency and to monitor the inoculum quantity needed given the nest size, as done in [Harris et al. 2000](#) (effect on emergence rate and adult survival).

The “contaminated food” modality was not very efficient on the adults for all the tested isolates, but we have to keep in mind that we chose protein food as a vector here, and therefore just a proportion of the workers may be interested in eating or collecting it for further use, *i.e.* mostly nutrition of the larvae. Adult hornets don't need proteins for their survival, they depend only on carbohydrates consumption ([Spradbery 1973](#), [Raveret Richter 2000](#)). [Monceau et al. 2013a](#) showed that the roles concerning nest defense of *V. velutina* individuals seem to evolve with their age, and we can thus hypothesize that the attraction for protein food could also depend on age. To assess the control potential of this modality at the nest scale, further studies on the impact of contaminated food on hornet's larvae should be investigated, using different kinds of food.

Axe 3

After having tested the fungi sprayed on nests, a potential **Trojan horse strategy** using entomopathogens could be envisaged in two different ways. First, by actively trapping and directly contaminating *V. velutina* workers with a spore solution before releasing them so they return to their colony. Second, by using food bait contaminated with the fungi, that will be brought back to the larvae: but to do this, a selective “trap” must be built that will capture and let go hornet workers with the contaminated food, but not other species.

We observed different responses of the entomopathogenic isolates according to the application methods. For a better efficiency of a potential biocontrol solution, a combination of several fungi isolates could thus be envisaged. Moreover, we used here homogeneous climatic conditions for the experimentation purpose, thus we did not consider the climatic requirements and adaptations of the isolates we tested ([García-Fernandez et al. 2008](#)): a combination of several isolates adapted to different climatic conditions could thus overcome such eventual limits and enhance the biocontrol efficiency ([Inglis et al. 1995](#)). Two risks could however be assessed in the case of isolate combinations: the possibility of **competition** between isolates and possible decrease of efficiency, and the **panel enlargement of non-target insects** that could be contaminated.

While classical neurotoxic insecticides are, most of the time, quite instantaneously lethal, the infected hornets died from 5 ± 0.44 days after infection, enhancing this way theoretically the potential risk of transmission of the fungi to other insects. This risk, not measured yet, may however appear to be very low in our case because: (1) once contaminated, hornets self-clean themselves and one-another by grooming, decreasing this way the potential transported inoculum (and increasing the intra-colonial transfer), (2) the UV deactivation of spores potentially transported by the hornets may be very efficient ([Ignoffo 1992](#), [Inglis et al. 1995](#), [Fernandes et al. 2015](#)), and added with dehydration it could impact significantly the spores survival on exposed surfaces visited by *V. velutina* workers: flowers (collection of nectar), wood (collection of wood pulp for nest construction), apiaries walls or flight board (for honeybee hunt), (5) fungi development may impact the mobility of infected hornets, decreasing this way their dispersion and potential contamination capacity (6) the fungi will not produce spores in high quantity before its total colonization of the host body (e.g. its host death).

Axe 3

While most of chemical insecticide used to treat hornets would accumulate in soil, water and other organisms by trophic network, infected hornets could be eaten by mammals and birds without risks, this kind of pathogens being specific arthropod parasites, and are easily degraded by the local micro fauna.

From an applied point of view, the efficiency of these isolates could be enhanced by adapted formulations, which could improve their infection efficiency, pathogenicity duration, climatic resistance, most of the time using carrier, natural or synthetic oils (Inglis *et al.* 1995, Thompson *et al.* 2006, Fernandes *et al.* 2015, Hicks 2016). All these factors make the formulation plays an important role for the persistency of entomopathogenic fungi in the environment (Burges 1998, Parker *et al.* 2015), when a good composition of additives could give a better way to hold the fungus species during time, even months after treatment.

To conclude, this is the first study exploring the potential efficiency of indigeneous entomopathogens to biologically control the invasive Asian hornet *Vespa velutina*. We tested five different isolates with different inoculation methods on workers, and found very efficient isolates especially when applied directly. Some further work will now be done on larvae and on whole nests, in different climatic conditions, to conclude about the potential treatment efficiency.

Author Contributions statement

JP, RLP and DT conceived the ideas and designed methodology; JP and RLP collected the data; JP and RLP analyzed the data; JP, DT and RLP wrote the manuscript.

Acknowledgements

This work was done during the PhD thesis of the first and the second author. We thank Olivier Bonnard and Salomé Gotreau for helping us capture the hornets used in the experiment. We thank Bayer Crop Science, represented by Bénédicte Laborie, for the first author financial support. The *Metarhisiium r.* strains are conserved at the CIRM-CF, certified ISO 9001, reference number :

Axe 3

EF3.5(1)=BRFM 2512, EF3.5(2)=BRFM 2513, EF3.5(3)=BRFM 2514 and EF2.5(2)=BRFM 2515 .

The *Beauveria b.* strain was deposited at the CNCM (Pasteur Institute), under the reference BB-Jubede-INRYER, with the registration code CNCM I-5254.

Conflicting interest.

The authors declare no conflicting interest in this research

Appendice

Table 1: Examples of biological control agent formulations in the market, for *Metarhizium sp.* and *Beauveria bassiana*.

Fungi	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
commercial appellation	AGO BIOCONTROL METARHIZIUM 50®, BioGreen®, GREEN GARD®, BIO 1020®, Green Muscles® (Bidochka and Small, 2005)	BioPower®, Naturalis®, Biosoft®, Ostrinil®

C.4.2 Evaluation de l'efficacité de molécules insecticides et de champignons entomopathogènes sur les larves de *V. velutina*

Cette expérimentation préliminaire est détaillée en **Annexe 3.1**

Résumé

Une stratégie de type Cheval de Troie chimique ou biologique pourrait être mis en place dans le but d'un contrôle efficace des colonies de *V. velutina*. Dans cette expérimentation, nous avons voulu tester l'impact de l'ingestion de **trois insecticides** (D, F et S)² et de **deux isolats d'entomopathogènes** (*B. bassiana* et *M. robertsii*) (EP) (EP BB et EP 3.5(1)) sur la survie de larves de *V. velutina*. Le choix des insecticides testés a été fait suivant leur mode d'action, direct ou perturbateur de mue, et les entomopathogènes choisis présentaient des résultats intéressants sur frelons adultes dans nos précédents travaux. Deux concentrations ont été testées pour chaque produit insecticide, à la dose homologuée officiellement pour un usage agricole et à une dose dix fois plus élevée. Pour chaque modalité, une trentaine de larves de *V. velutina* de stades 4-5 provenant d'une même colonie ont été testées. Chacune des 300 larves était nourrie 3 fois par jour et était maintenue dans sa galette à 23°C durant la durée de l'expérience. Chaque larve a reçu à la becquée 5µL de solution de produit ou de spores, ou seulement de l'eau pour les témoins. Puis nous avons suivi l'évolution de l'activité des larves à 24h pour celles testées par des produits, ainsi qu'à 72h pour les EP, dont le développement demande d'avantage de temps, suite à une stimulation mécanique. Les témoins ont très bien survécu à l'essai, le produit S a eu une létalité totale à 24h à la dose x10 mais aucun effet à la dose homologuée. A l'inverse, le produit F a été létal pour plus de la moitié des larves appliqué à sa dose homologuée, mais n'a eu aucun effet à dose x10. Pour finir, le produit D n'a eu aucun effet quelle que soit sa dose d'application. Concernant les entomopathogènes, des émergences d'adultes inopinées dans les galettes testées durant l'expérience ont provoqué la mort d'une grande partie des larves, dont les exsudats étaient leur seule source de nourriture sucrées. Les EP étant incapables de se développer dans des insectes morts dans les premiers stades infectieux, nous ne pouvons rien conclure de ces modalités. Cet aspect pourra facilement être amélioré en tuant les nymphes avant de démarrer l'expérience. Cette expérimentation a permis de faire un premier screening de produits, mais surtout de développer une méthode intéressante pour de futurs essais sur couvains de *V. velutina*. (Pour plus de détails, voir la Discussion de la thèse.)

² L'identité de ces trois insecticides est confidentielle, ils sont donc mentionnés sous les noms de code D, F et S.

DISCUSSION GENERALE



Rappelons ici que cette discussion a pour but non pas de reprendre les discussions déjà conduites dans les différents articles et manuscrits, mais bien d'approfondir des points de réflexions, des suggestions de recherches et de projets dans la continuité de ces travaux, dans un cadre plus global.

Discussion Générale et suggestions de pistes de recherches ultérieures.

Depuis son arrivée en France vers 2004, *V. velutina* a étendu son aire de répartition, jusqu'à être présent aujourd'hui dans une grande partie de l'Europe occidentale, et est devenu de par sa consommation privilégiée d'abeilles une menace majeure pour l'apiculture mais également pour la biodiversité (Monceau *et al.* 2014a, Monceau & Thiéry 2017). Hyménoptère social, ce prédateur fait des colonies de grande taille, et seule la destruction directe ou indirecte de ces dernières a su montrer des résultats intéressants pour contrôler son expansion. Les données concernant la biologie et l'écologie des colonies de *V. velutina* étant lacunaires à plusieurs moments clés de son développement, l'objectif de ces travaux de thèse était d'apporter de nouveaux éléments permettant d'évaluer et de proposer des stratégies de contrôle durables pour cet insecte.

Sujet peu abordé chez les frelons en général, nous avons dans un **premier Axe** exploré plusieurs aspects de la **biologie des reproducteurs** de *V. velutina* potentiellement intéressants pour en envisager le contrôle ou la perturbation, afin de diminuer en amont le nombre de colonies. Nous avons ainsi pu montrer en étudiant la **maturation sexuelle des mâles** de *V. velutina* (Article 1, publié), que ces derniers avaient une spermatogenèse synchrone et qu'ils constituaient leur stock de spermatozoïdes 10 jours après leur émergence. Ces travaux nous ont également permis de montrer que la fertilité des mâles était plus faible en fin de printemps qu'elle ne l'était en automne, mais que les mâles possédaient un stock de spermatozoïdes largement excédentaire, quelles que soient leur période d'émergence. En comparaison à la contenance de la spermathèque des femelles, un seul accouplement serait en théorie suffisant pour les remplir, sans compter le fait que les gynes de *V. velutina* peuvent s'accoupler plusieurs fois. Dans un second temps nous avons voulu **évaluer et comparer certains traits liés à la fertilité des fondatrices** chez le frelon asiatique invasif *V. velutina* et le frelon européen natif *V. crabro* (Manuscrit 2, soumis, travaux présentés en congrès IUSSI-EU). Nous avons

ainsi mis en évidence de grosses différences dans le timing de maturation ovarienne entre ces deux espèces, les fondatrices de *V. velutina* démarrant leur maturation ovarienne et étant prêtes à pondre un mois avant celles de *V. Crabro*. Ces travaux ont également permis de mettre en évidence un stockage de deux fois plus de spermatozoïdes, plus courts, dans la spermathèque plus petite des fondatrices de *V. velutina* comparées à celles de *V. crabro*. Dans un troisième temps nous avons commencé à **tester l'existence d'une sélection spatiale de certains critères dispersifs dans les populations de marge de l'invasion**, dans une première expérimentation présentée en [Annexe 1.1](#), et avons lancé un projet collaboratif de science participative pour collecter des échantillons à travers l'Europe et tester nos hypothèses, EUROFRELON ([Annexe 1.2](#)). Le **comportement de reproduction de *V. velutina*** reste encore très peu décrit, et nous avons voulu commencer à explorer certains points de cette étape clé du cycle chez *V. velutina* ([Annexe 1.3](#)), en testant certains aspects inconnus comme le choix du partenaire par origine coloniale ou par âge, ou encore tenter de comprendre la part « sociale » de ce comportement chez les mâles, qui semblent préférer faire des tentatives d'accouplements alors qu'ils sont en groupe.

Dans le **deuxième Axe** nous nous sommes intéressés à la **biologie des colonies, de la récolte à l'utilisation des ressources dans la colonie**. Dans un premier article ([Manuscrit 3, soumis, travaux présentés en congrès Coloss Velutina 2017](#)), nous avons mesuré grâce à un marquage électronique (RFID) **les capacités de retour à la colonie de 320 ouvrières** de *V. velutina* jusqu'à 5km, et évalué **leur rayon d'action** classique entre 500 et 1000m autour de leur nid. Ces travaux nous ont également permis de décrire de manière plus précise l'activité des ouvrières, majoritairement constituée de vols courts entre 7h et 20h. Dans un deuxième article ([Manuscrit 4, en préparation](#)), l'évolution de la **distribution de sucre et de protéines** marqués par des métaux lourds a pu être observée dans des colonies à différents stades, permettant ainsi de visualiser de manière plus précise les réseaux de trophallaxie, mais également d'évaluer l'intérêt de ces ressources comme potentiels vecteurs dans la mise en place de technique de lutte de type Cheval de Troie. Ainsi, à l'inverse des larves, les ouvrières reçoivent plus de sucre que de protéines, qui semblent être réservées pour les plus grosses d'entre elles.

Dans l'introduction nous avons passé en revue les diverses méthodes actuellement mises en place dans la lutte contre *V. velutina*, et avons conclu qu'une méthode de biocontrôle des colonies serait la solution la plus intéressante à développer. C'est pourquoi, après avoir exploré dans les deux premiers axes différents aspects théoriques sur la reproduction, l'initiation et le fonctionnement des colonies, nous avons dans un **troisième Axe** décrit une piste possible de **biocontrôle de *V. velutina***. Dans cette partie nous avons commencé à décrire morphologiquement et génétiquement une souche d'entomopathogène *B. bassiana* isolée dans une reine de *V. velutina* au printemps 2016 ([Manuscrit 5, en préparation](#)). Nous avons ensuite évalué dans nos travaux, l'efficacité de différents isolats de champignons entomopathogènes ainsi que différentes méthodes d'application de ces parasites ([Manuscrit 6, soumis, travaux présentés en congrès SIP 2017](#)). Il en est ressorti que certains isolats sélectionnés permettaient de contrôler *V. velutina* dans des proportions très intéressantes, que l'inoculation par immersion était la plus létale, et que les surfaces et partenaires infectés pouvaient dans certains cas suffire pour infecter les frelons.

Dans la section suivante, nous remettrons en perspective les résultats trouvés dans les travaux présentés précédemment dans un contexte plus général, et pour plus d'originalité en comparaison avec les discussions déjà présentes dans les axes, nous nous attacherons à proposer ici des réflexions, pistes de recherche et protocoles précis et innovants.

1. Biologie des reproducteurs

1.1. Biologie des mâles de *V. velutina*

Dans un premier temps, il serait intéressant de répondre à certaines questions soulevées dans l'étude sur la maturation sexuelle des mâles ([Article 1](#)). Nous avons montré dans l'étude en question que les mâles précoces chez *V. velutina* étaient peu fertiles, mais nous n'avons pu qu'émettre l'hypothèse que ces mâles étaient diploïdes. En effet, chez de nombreux hyménoptères, ces deux paramètres se révèlent être connectés ([Stouthamer et al. 1992](#), [Agoze et al. 1994](#)). Il serait donc utile de **relier le caryotype des mâles de frelons avec leur fertilité** pour valider ou infirmer cette hypothèse explicative. L'étude de la diploïdie des mâles présents dans les colonies de *V. velutina* au cours du temps effectuée par [Darrouzet et al. 2015](#) a permis de mettre en évidence le fait qu'une grande majorité des mâles de *V. velutina* étaient diploïdes dans les colonies tout au long de l'année. Il semblerait donc probable que l'alimentation larvaire des futurs mâles ou les conditions climatiques différentes entre les deux périodes observées, aient également un rôle à jouer dans la fertilité des individus. Afin **d'évaluer la part des facteurs génétiques, climatiques et nutritionnels** dans la fertilité des mâles de *V. velutina*, il pourrait être envisagé de mesurer l'évolution de la fertilité de différents mâles issus de colonies maintenues à différentes températures, et de contrôler la quantité et la qualité de la nourriture disponible pour les colonies ainsi que la diploïdie de ces mâles.

Le devenir des mâles une fois qu'ils ont quitté leur colonie est encore inconnu : cherchent-ils d'autres colonies pour se reproduire ? Ou bien patrouillent-ils sur des sites potentiellement intéressants pour rencontrer des gynes (passage, nourriture)? Afin d'avancer sur ces observations *in natura*, il pourrait être utile de **se focaliser sur le déplacement des mâles** après émergence avec des émetteurs actifs ([pour plus de détails techniques voir le point 2.2 de cette discussion](#)). En associant ces observations avec des données de biologie (dissections à postériori) il serait ainsi possible de quantifier les proportions de reproductions à divers endroits chez cette espèce (au nid, sous le nid, dans des sites de nutrition etc...). Il serait également possible de cette manière de détecter si les mâles ont un comportement de défense des colonies comme décrit par [Perveen & Shah 2013](#).

Enfin, il semblerait important de tester la **capacité reproductive de mâles diploïdes de *V. velutina*** : sont-ils évités par les femelles ou agressés comme décrit dans l'[Annexe 1.3](#) ? Peuvent-ils s'accoupler comme décrit chez d'autres mâles diploïdes dans d'autres espèces d'hyménoptères ([Cowan & Stahlhut 2004](#))? [Krieger et al. 1999](#) ont mis en évidence une proportion importante (12%) de femelles triploïdes chez la fourmi invasive *Solenopsis invicta* ; on pourrait se demander quelle proportion des femelles produites dans les colonies de *V. velutina* est triploïde ? Si elles existent, ces femelles ont-elles un comportement social et reproductif différent?

1.2. Biologie des femelles de *V. velutina*

Dans le [Manuscrit 2](#), nous avons montré que les fondatrices de *V. velutina* avaient une date de maturation ovarienne au printemps bien plus précoce que celui de *V. crabro*, et il serait intéressant de savoir si ce phénomène est purement lié à une sortie d'hivernation plus précoce, ou bien connecté à une vitesse de maturation plus élevée.

Nous avons supposé qu'une compétition pour les ressources et les sites de nidification entre ces deux espèces pouvait être probable, la compétition interspécifique étant classique chez les vespides ([Spradbery 1973](#), [Edward 1980](#), [Matsuura & Yamane 1990](#), [Cervo et al. 2004](#)), et un remplacement des communautés de frelons par *V. velutina* ayant eu lieu en Corée suite à son invasion ([Choi et al. 2012](#)). Il semble très important ici d'aller plus loin sur des observations de terrain de nids primaires, pour **évaluer la compétition inter et intra-spécifique chez les reines de frelon *V. crabro* et *V. velutina***, en effectuant de nombreuses observations et comptage d'attaques et d'usurpation. Une expérimentation préliminaire, non présentée dans ces travaux, conduite en partenariat avec un apiculteur a permis par exemple de compter 12 tentatives d'usurpation de reines de *V. velutina* pour un seul nid de la même espèce en Bretagne ([D. Jaffré pers. com.](#)).

Dans son étude de l'évolution des communautés de frelons en Corée suite à l'invasion de *V. velutina*, [Choi et al. 2012](#) ont mis en évidence que *V. velutina* était devenue l'espèce ultra majoritaire en zones urbanisées, alors qu'il était anecdotique en zones forestières, sa répartition suivant un gradient proportionnel au degré d'urbanisme de l'aire observée. [Nadolski 2012](#) a de plus montré que certaines

caractéristiques coloniales (taille, population) pouvaient évoluer au sein d'une même espèce de frelon suivant si elle était située en zone urbaine ou rurale. Dans le [Manuscrit 2](#) nous avons capturé des reines urbaines et rurales, et il pourrait être intéressant dans une expérimentation à plus large échelle de quantifier la présence de *V. crabro* et *V. velutina* et de mesurer les caractéristiques reproductives dans différents scénarios climatiques mais surtout paysagers de ces deux espèces. De plus, on peut supposer que les frelons des zones rurales aient une alimentation riche en insectes, et par conséquent soient plus sensibles aux pesticides que les frelons des zones urbaines, dont le bol alimentaire est complémenté par les étals, déchets et autres sources d'alimentation humaine. L'exposition aux pesticides agricoles et l'incidence sur les comportements de chasse des frelons fera par exemple l'objet d'un projet soumis par mon unité de recherche.

1.3. Spatial sorting chez *V. velutina*

En [Annexe 1.1](#) nous avons observé de grosses différences morphologiques entre les reines italiennes et françaises, mais n'avons pas pu conclure quant à la part respective du génotype et du climat sur ces différences de phénotype. Dans un premier temps, le projet de science participative EUROFRELON ([Annexe 1.2](#)), lancé au printemps 2017, permettra de décrire précisément les potentielles différences morphologiques et génétiques observable chez les reines de *V. velutina* provenant de diverses zones climatiques et de régions envahies en fonction de l'ancienneté de l'invasion. Afin de **différencier au mieux adaptation et adaptabilité**, des essais sur plus d'une génération en conditions contrôlées pourraient être envisagés.

Le « spatial sorting » englobe beaucoup d'évolutions différentes chez les populations d'organismes invasifs : dans la littérature on parle d'**évolution morphologique** (capacité de dispersion optimisées sur les fronts) (démontré récemment chez un vespidé dans [Barachi et al. 2017](#)), ainsi que d'**évolution comportementale**, avec par exemple en Australie un comportement dispersif bien plus développé chez les individus de front d'invasion du crapaud buffle comparé à la zone d'introduction de ce batracien ([Brown et al. 2014](#)). L'évaluation du **comportement dispersif de fondatrices de *V.***

velutina pourrait être envisagée, avec un protocole basé sur l'observation des capacités exploratoires de reines dans une cage d'exploration similaire à celle présentée dans [Monceau et al. 2015b](#), avec des reines provenant de différents sites proches ou non des fronts d'invasion.

L'exploration va de pair avec des **capacités neurologiques** liées à la détection, à l'orientation : il pourrait également être intéressant de creuser des possibles évolutions neurologiques chez les populations de front de *V. velutina*, apportant ainsi un nouvel angle d'étude de cette question évolutive.

1.4. Biologie de la reproduction chez *V. velutina*

Lors de nos essais sur la reproduction de *V. velutina* ([Annexe 1.3](#)), nous avons observé que les mâles semblaient attirés par les femelles en laboratoire, mais aucun signal chimique ou visuel n'a pu être mis en évidence qui permettrait une attraction à longue distance ([Cini & Capa et al. com pers. Coloss Turin & Coloss Majorca](#)). Une phéromone d'attraction sexuelle telle que celle existant chez *V. crabro* ou *V. mandarinia* a très récemment été décrite chez *V. velutina* par [Wen et al. 2017](#), et les structures macroglomérulaires responsables du traitement de l'information phéromonale ont été identifiées ([Couto et al. 2016](#)). En tout état de cause, il semblerait qu'elle n'agisse qu'à très faible distance ([Cini & Capa 2017, Coloss Majorca](#)), contrairement aux phéromones sexuelles de papillons ([Ioratti et al. 2011](#)). Il est alors difficile d'espérer que de telles phéromones puissent permettre une forte attraction à distance, et donc d'envisager l'usage de pièges à phéromones (capture de mâles) ou des diffuseurs de phéromones éloignés des nids (confusion sexuelle). Peut-être qu'*in natura* les mâles se reproduisent soit dans les nids, qui possèderaient alors une odeur qui attireraient les mâles, soit dans des sites de ressources de nourriture par lesquels ils seraient alors attirés. Des **essais d'attractivité** par ce genre de signaux olfactifs assistés par exemple par des approches neurobiologiques dans la continuité des travaux d'Antoine Couto ([Couto et al. 2014, 2016](#)) sembleraient, en tous cas, appropriés pour éclaircir ce point. Des odeurs de différentes colonies, ayant ou non commencé à produire des

reines pourraient par exemple être présentées, ainsi que différentes odeurs de ressources alimentaires « classiques » rencontrées par les mâles *in natura* (lierres, saules, plantes à miellat d'automne).

De nombreuses questions quant à la reproduction chez *V. velutina* persistent : nous n'avons pas encore pu observer d'accouplements en laboratoire où des spermatozoïdes ont pu être retrouvés dans le tractus femelle. Il nous reste donc à déterminer les conditions requises pour un accouplement réussi. Dans ces conditions, nous pourrions étudier comment les femelles choisissent le mâle pour l'accouplement et évaluer le poids de certains paramètres sur ce choix (origine, caractéristiques morphologiques, fertilité et haplo/diploïdie du mâle ; présence d'autres mâles autour).

1.5. Hivernation

Des groupes de trois ou quatre fondatrices hivernantes dans des souches d'arbres ont été observés en 2015 et 2016, lors des campagnes de captures pour le [Manuscrit 2](#) et les [Annexes 1.1](#) et [1.2](#). Il pourrait être intéressant de savoir si, comme chez certaines guêpes polistes, des reines de *V. velutina* de différentes colonies se regroupent pour hiverner ([Dapporto et al. 2004](#)), ou bien s'il s'agit d'un phénomène uniquement intra colonial. Ce point nous paraît capital à traiter, si l'on veut pouvoir lutter contre les fondatrices avant l'initiation des colonies de printemps. Des tests sur les signatures en hydrocarbures cuticulaires, partagées par des individus d'une même colonie ([Gévar et al. 2017](#)), pourraient surement permettre de répondre à cette question. De même ces tests pourraient être réalisés sur des **colonies initiées très proches** les unes des autres, observées de temps en temps. Dans le cas d'une très proche parenté permettant l'initiation de nids très rapprochés, cela soulèverait des problématiques proches de celles observées chez la fourmi argentine, *Linepithema humile*, où les différences génétiques entre colonies sont tellement faibles suite à son introduction en Amérique et en Europe, que les colonies agissent comme des « super colonies », supportant beaucoup mieux la concurrence de leurs congénères dans leur environnement ([Hölldobler & Wilson 1990](#), [Holway et al. 1998](#)). Des reines d'une même colonie cherchent-elles un site d'hivernation et un site d'initiation en

petit groupe ? Cette solution pouvant permettre en collaborant de mieux résister aux agressions hivernales ? Une acceptabilité élevée des ouvrières introduites dans les colonies étrangères a été observée en laboratoire : qu'en est-il *in natura* ? Et entre reines ? Dans un premier temps avec une méthode RFID il pourrait être possible d'évaluer la dérive et la survie d'ouvrières entre diverses colonies. La dérive est un phénomène classique chez les abeilles domestiques, sans pour autant être lié à des proximités génétiques, mais nous manquons encore d'informations sur la fréquence de ce genre de comportements chez les guêpes.

2. De la collecte de ressources à leur utilisation dans les colonies de *V. velutina*

2.1. Spécialisation alimentaire

L'expérimentation présentée sur le choix des ressources alimentaires chez *V. velutina* (présentée en [Annexe 2.1](#)) se heurte à différentes problématiques liées au dispositif expérimental choisi lors de nos essais: la période d'adaptation, les différents sites de capture, le confinement en espace restreint... Autant de contraintes qui ont pu interférer avec l'observation du comportement potentiellement spécialisé dans la collecte de certaines ressources des ouvrières de *V. velutina*. L'usage de la technique RFID pourrait ici nous permettre de répondre à cette question de manière plus précise et rigoureuse. En plaçant des portails à l'entrée de différents bacs à appâts, et en suivant passivement l'activité des ouvrières pour leur collecte, il serait possible de **détecter des formes de spécialisation**, mais également des **évolutions dans le temps du type de collecte chez les individus**. On pourra envisager de déplacer les sources de nourriture, ou bien d'en supprimer, et d'observer ainsi l'évolution des comportements individuels de collecte. La [Figure 28](#) schématise l'installation expérimentale pouvant être mise en place pour étudier cette question. Ce type de dispositif n'a toutefois pas pu être testé durant cette thèse, faute de temps.

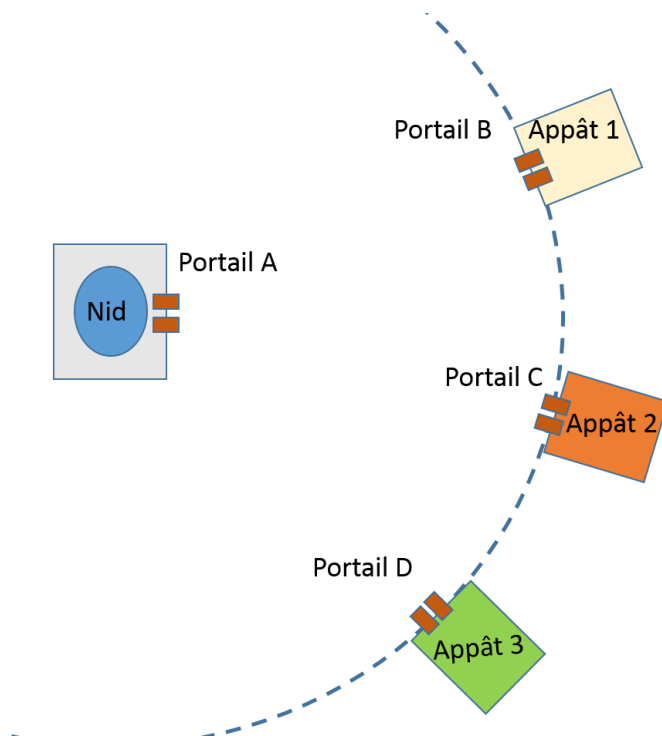


Figure 28 : Design expérimental pour tester le degré de spécialisation pour la collection de différentes ressources chez *V. velutina*, en utilisant des portails RFID placés au nid et à l'entrée de nourrisseurs contenant des ressources variées (portails B, C, D).

2.2. Rayon d'action des ouvrières et détection des colonies

Dans notre article sur la capacité de retour au nid du frelon asiatique ([Manuscrit 4](#)), nous avons pu obtenir une estimation du rayon d'action maximum de *V. velutina* (5km) et classique (<1km) de cette espèce autour de son nid, de manière indirecte, grâce à l'usage de la technique du RFID. Il pourrait cependant être intéressant d'aller plus loin, et **d'évaluer les paramètres ayant un rôle à jouer dans l'évolution de ce rayon d'action et des densités de nids**. Ces informations seraient importantes pour modéliser et estimer l'impact potentiel des colonies de *V. velutina* dans leur environnement. La quantité et la qualité des ressources alimentaires et la composition du paysage pourraient par exemple être structurantes comme chez les bourdons ([Osborne et al. 2008](#)).

Des expérimentations visant à **détecter les nids à l'aide de radio émetteurs** portés par des ouvrières de *V. velutina* ont été démarrées, en collaboration avec Dr. Peter Kennedy ([Figure 29.A](#)) et Juliet

Osborne de l'Université d'Exeter. La problématique repose ici sur notre capacité à trouver un compromis optimal entre le poids d'un tag à placer sur le dos du frelon, et au rayon de détection des appareils. Ici le fait d'influer par une grande charge la « qualité » du vol des frelons n'est pas important, il ne faut cependant pas les empêcher de retourner à leur nid. Certains outils de tracking comme le système Recco® (Figure 29.B) ne nécessitent pas d'émission d'onde par la puce (donc sans batterie), et sont donc très légers, mais avec un rayon de détection très faible (60m). Un autre système de tag, actif cette fois-ci car un signal est émis par la puce (reliée à une batterie), est bien plus lourd (Figure 29.C), mais a un rayon de détection plus important (>150m). Tous ces systèmes ont une pénétration suffisamment importante pour détecter un frelon à travers des feuillages, contrairement au radar harmonique.

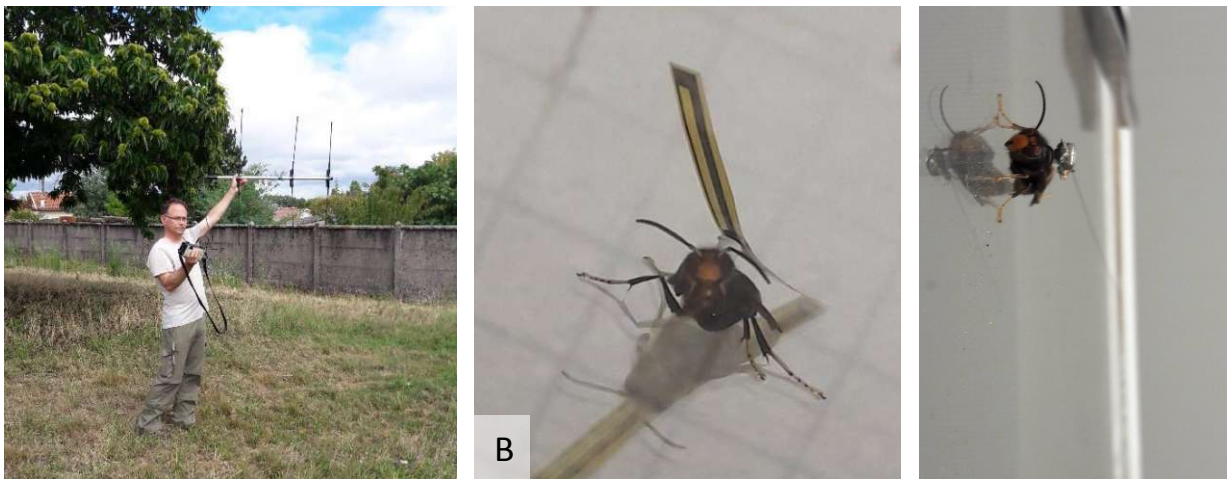


Figure 29 : A. Scientifique (Dr P. Kennedy) en train d'utiliser un système de télémétrie radar pour détecter un signal provenant d'une puce active transportée par un frelon (expérimentations conduites à l'UMR INRA Save). B. Frelon équipé d'une puce Recco® (puce passive donc non émettrice) fixée sur son thorax. C. Frelon équipé d'une puce active associée à une batterie sur son thorax.

2.3. Distribution de la nourriture dans les colonies de *V. velutina*

Dans le [Manuscrit 4](#) présenté dans ces travaux, nous avons exploré la manière dont évoluait la distribution de nourriture par une ouvrière dans les colonies de *V. velutina* avec leur structure, en marquant de la nourriture protéique et sucrée avec des métaux lourds, Rubidium et Césium, et en regardant comment ces traceurs étaient distribués parmi les membres de la colonie après 24h. Notre approche a été de « fixer » des paramètres connus pour pouvoir influencer la distribution de nourriture dans des colonies d'hyménoptères sociaux, *e.g.* la température, le degrés de satiété des colonies et le nombre d'ouvrières distributrices ([Markin et al. 1970](#)), de manière à se concentrer essentiellement sur l'impact que pouvait avoir la taille et la structure des colonies (castes et stades présents et leurs proportions) sur ce comportement.

Nous avons observé que les différentes castes et stades ne recevaient pas les mêmes types de nourriture, les larves recevant plus de protéines que de sucres quand l'inverse est observé chez les ouvrières, ce qui était un résultat attendu ([Montagner 1963](#)). Mais nous n'avions pas envisagé la possibilité d'une adaptation de l'apport nutritif en fonction du statut des membres de la colonie. Ainsi, les larves les plus légères reçoivent plus de sucre et les ouvrières les plus grosses plus de protéines. Nous avons également pu observer que dans les colonies où ils étaient présents, les mâles n'ont reçu de la nourriture (du sucre) que lorsqu'il n'y avait pas de larves dans la colonie, ce qui laisserait supposer que les larves soient prioritaires pour cette ressource vis-à-vis des mâles. Le vecteur le plus intéressant ressortant de notre étude semble être la solution protéique, qui vise à la fois le couvain et les ouvrières les plus grosses, plus enclines à chasser. Par contre les mâles et les gynes n'ont été que très peu marqués dans cette expérimentation, et un effet cumulatif serait intéressant à estimer pour évaluer à partir de combien d'ouvrières vectrices ces cibles commencent à être impactées.

Dans la continuité des travaux de [Markin et al. 1970](#), il serait intéressant d'observer dans des colonies de structures et tailles « calibrées », comment la distribution de nourriture évolue avec la température, par exemple en maintenant des nids dans des chambres climatiques à plusieurs températures. De plus, au lieu de travailler à l'échelle d'une seule ouvrière, il pourrait être envisagé de regarder les effets

cumulatifs d'une distribution continue de nourriture marquée pendant un temps plus court, en laissant les appâts à disposition des ouvrières *ad libidum* le temps de l'expérimentation.

Nous manquons encore d'informations basiques sur la biologie de *V. velutina*, comme par exemple l'impact de la température ou du type de nourriture reçue sur sa vitesse de développement larvaire, nymphale et sa survie et fertilité à l'âge adulte... Ces aspects seraient pourtant également très importants à étudier.

3. Biocontrôle de *V. velutina*

3.1. Amélioration des formulations et choix des souches de champignons entomopathogènes

Dans l'**Axe 3** de ces travaux de thèse, nous avons mis en évidence le potentiel prometteur de l'usage de certains isolats de champignons entomopathogènes généralistes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium robertsii* pour le biocontrôle de *V. velutina*. De manière générale, le goulot génétique subit par *V. velutina* lors de son invasion va dans le sens du développement d'une méthode de lutte biologique basée sur un ou plusieurs organismes parasites : le peu de diversité dans les populations cibles devrait limiter la variabilité potentielle d'efficacité des agents choisis liée à la génétique des cibles (Lacey *et al.* 2015). Plusieurs pistes restent encore à explorer dans cette continuité. Un **screening plus exhaustif de souches de collection de champignons entomopathogènes spécialisées en vespides ou commercialisées** en Europe pourrait être dans un premier temps effectué. Des essais testant différentes concentrations, formulations, mélanges de souches pourraient également être envisagés. La toxicité potentielle et les risques liés à l'utilisation de ces agents biologiques devront également être rigoureusement évalués.

L'efficacité de ces souches devra également être ré-évaluée sur des larves, en prenant en compte les travaux de Harris *et al.* 2000, où pour empêcher l'émergence d'adultes pendant les essais, les cellules des nymphes sont percées à l'aide d'une épingle avant de lancer l'expérience.

L'odeur des champignons entomopathogènes peut parfois être répulsive dans des appâts, comme montré par exemple dans [Mburu *et al.* 2009, 2010, 2013](#). Dans ces études les auteurs ont mis en évidence un lien entre la virulence des pathogènes et leur effet répulsif pour des termites, et isolé les molécules impliquées dans ce comportement. Cet aspect devra être pris en compte dans le choix de souches dans un objectif de traitement de type Cheval de Troie pour *V. velutina*. La formulation des traitements à base de spores pourrait également jouer un rôle dans l'appétence de l'appât, afin de le rendre plus attractif. Des dispositifs de contamination des ouvrières devront être testés afin de pouvoir les contaminer en dehors du nid.

3.2. Evaluation de l'impact de champignons entomopathogènes sur des colonies entières

Afin d'évaluer de manière plus réaliste l'impact de traitements avec des entomopathogènes sur *V. velutina*, des expérimentations devront être réalisées sur des colonies entières, de différentes tailles, soit en injectant la solution de spores dans le nid à la manière des traitements chimiques actuellement appliqués, soit à l'aide d'appâts les contenant, que les ouvrières iront collecter et distribueront dans leur colonie (Cheval de Troie). Une attention toute particulière devra dans ce dernier cas être portée à la sélectivité de l'appât attractif. La contamination « active » de frelons capturés devant les ruches pourrait également être envisagée : il semblerait intéressant de fabriquer une « enceinte de contamination », par exemple un shaker contenant les spores en poudre, dans lequel on forcera le contact entre le frelon et les spores avant de le relâcher.

Dans **l'Axe 2.3** nous avons pu développer la technique d'encagement de nids de frelons et d'équipement en RFID, et dans **l'Axe 3.2** nous avons testé différents isolats de champignons entomopathogènes capables d'infecter les adultes de frelons asiatiques en laboratoire. Nous présentons ci-dessous un protocole pour évaluer l'impact en semi-field d'un traitement par ces parasites sur un nid de frelon entier ([Figure 30](#)).

Pour cela, nous allons encager 2 nids et les équiper :

- à la fois d'un **système RFID** afin de suivre le niveau d'activité des ouvrières et leur évolution après traitement (durée des vols, timing, nombre de vols, survie)
- ainsi que d'une **balance électronique** pour surveiller l'accroissement de population et détecter une potentielle délocalisation de la colonie. La balance fait une mesure toutes les 10min à la fois du poids, mais également de la température, et envoie les données directement en ligne.

Les deux cages sont isolées à la fois par une coque de carton mais également par un « paravent » pour éviter une potentielle dérive lors du traitement. Les cages n'étant grillagées que sur trois faces, les risques de contamination « directe » sont somme toute limités. Mais grâce au marquage électronique des frelons des colonies et à la présence de portails à leur entrée, la dérive et du coup l'impact d'une contamination indirecte liée à ce phénomène pourront être évalués

Design expérimental

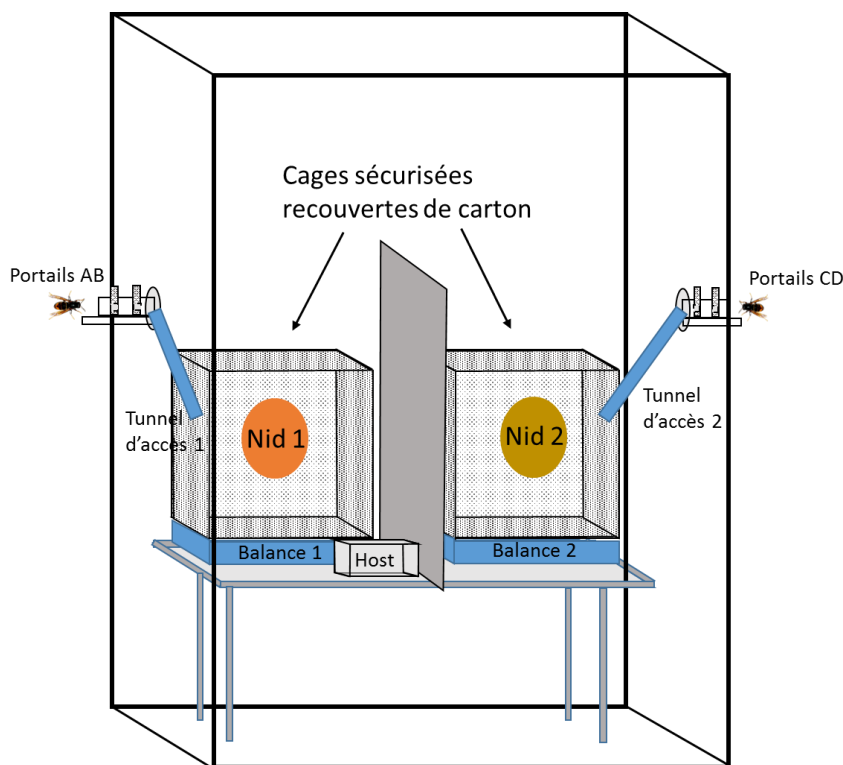


Figure 30 : Schéma de l'installation expérimentale à développer pour l'évaluation de l'efficacité de traitements avec des entomopathogènes sur une colonie entière de frelon. Un

des deux nids sera traité, l'autre sera un témoin (il ne recevra que de l'eau à la place de la solution de spores). Le suivi automatisé des individus sera permis par le marquage électronique des individus des deux colonies et leur détections par les portails placés à la sortie des colonies (AB et CD respectivement). (Schéma J. Poidatz).

Ces expérimentations sont envisagées en fin d'année 2017.

Conclusion générale

Outre leur nuisance pour l'environnement colonisé, les invasions biologiques proposent souvent un modèle d'étude de choix. Elles permettent l'étude de processus populationnels d'adaptation et d'évolution très particuliers avec leur nouvel environnement. Dans mes travaux de thèse présentés ici, j'ai tenté d'apporter des éléments de compréhension sur la biologie du frelon asiatique invasif *V. velutina* à des étapes clés du développement de ses colonies afin d'apporter des éléments utiles pour développer des stratégies de contrôle durable de ses colonies.

Nous avons tout d'abord travaillé sur la période reproductive chez *V. velutina*, en décrivant la maturation sexuelle des mâles et le comportement de reproduction. Puis nous nous sommes intéressés à la période d'initiation de la colonie, en analysant les capacités reproductrices des fondatrices de *V. velutina* en regard avec celles des fondatrices du frelon européen *V. crabro*, mais également en observant une potentielle évolution des capacités de dispersion de ces fondatrices à travers son aire de répartition via une sélection spatiale de traits pionniers sur les marges de sa zone d'invasion.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au fonctionnement des colonies de frelons, via l'étude de la capacité de retour à leur nid, de l'évaluation des limites de leur rayon d'action et de l'activité journalière des ouvrières en lien avec le climat. Nous avons également observé dans quelle mesure la distribution de sucre et de protéines pouvait évoluer dans les colonies suivant leur taille et leur structure, mettant ainsi en évidence l'intérêt de l'usage de protéines comme vecteurs pour une potentielle stratégie de type Cheval de Troie.

Enfin, nous avons travaillé sur des méthodes potentielles de contrôle des colonies de frelons, via la description et l'évaluation de souches de champignons parasites, ce qui a pu mettre en exergue leur possible intérêt dans la lutte contre *V. velutina*.

Bien que cette thèse ne soit qu'une première étape dans la compréhension de la biologie du frelon invasif *V. velutina*, elle aura permis de confirmer l'intérêt d'une orientation des recherches vers une stratégie bien précise de perturbation biologique des colonies. De nombreuses questions restent bien sûr encore à explorer, en particulier dans la compréhension de la reproduction de cette espèce, de son comportement de fourragement ainsi que dans le choix, la formulation des agents de biocontrôle et leur application dans les colonies. A la fin de ces travaux, nous avons donc proposé différentes pistes de recherche à envisager. Ces travaux ont pu à la fois apporter des éléments nouveaux sur la compréhension de la biologie des frelons, mais également sur des pistes de contrôle de ce prédateur invasif.

Dans le cadre de cette thèse CIFRE, j'ai été amenée à réaliser un travail transversal reposant sur de nombreuses techniques pour collecter ou analyser mes échantillons: dissections, microscopie, science participative, marquage chimique, ICPMS, radio-tracking, analyses de vidéos, biologie moléculaire, entomopathologie... J'ai eu la chance de travailler avec des apiculteurs (amateurs ou professionnels), des associations, des scientifiques, des journalistes, des particuliers ; mais également d'aller présenter mes travaux à de nombreuses conférences en France et à l'étranger, ce qui a participé au développement de mon réseau professionnel et a facilité mon insertion dans la vie professionnelle.

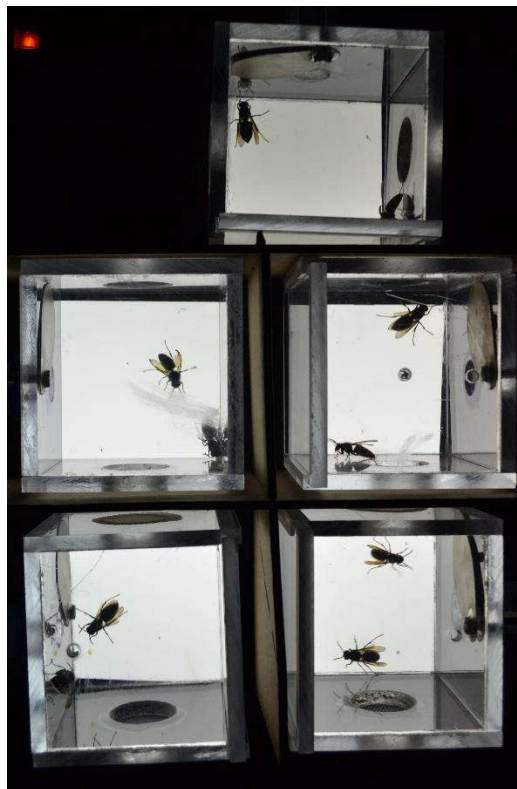
Le « retour vers le futur » ([Lacey et al. 2015](#)) observé depuis les années 2000 sur l'usage d'entomopathogènes en tant qu'agents de lutte biologique est encourageant pour la suite de ce champ de recherche prometteur, qui devient de plus en plus attractif pour les industries. Il est vrai que le biocontrôle est un domaine plus complexe à envisager comparé à la plupart des molécules chimiques, car une attention particulière doit être portée à la biologie et l'écologie à la fois des agents et des cibles pour optimiser leur efficacité, et ce principe a d'ailleurs été le fil directeur de ces travaux de thèse : aller de la compréhension de la biologie vers le contrôle. Malgré tout, la prise de conscience de la dégradation des écosystèmes et de l'importance de la mise en place de techniques de gestion durable

des nuisibles font que les agents de biocontrôle occupent maintenant une part non négligeable du marché des produits de contrôle d'invertébrés (10 à 15% en 2017, [Robert D. International Symposium of the Society of Invertebrate Pathology 2017, San Diego](#)). Le biocontrôle devenant une des solutions de gestion des nuisibles du futur, l'intensification des progrès scientifiques et techniques devrait permettre son usage durable et généralisé.



ANNEXES

ANNEXES Axe 1



Installation expérimentale pour l'observation du comportement de reproduction chez *V. velutina*. (Photo de J. Poidatz).

ANNEXE 1.1: Sélection spatiale chez *Vespa velutina* : Compromis entre traits dispersifs et reproductifs chez les fondatrices de *V. velutina* entre la Bretagne, l'Italie et le Bordelais.

Juliette Poidatz¹, Alessandro Cini², Rita Cervo², Olivier Bonnard¹, Denis Thiéry¹.

(1) INRA, UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, Bordeaux Sciences Agro, ISVV, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

(2) Department of Biology, University of Florence, Via Madonna del Piano 6, 50019 Sesto Fiorentino, Florence, Italy

Introduction

Chez les insectes, l'évolution de la taille dépend principalement de la nourriture reçue au stade juvénile et du climat de l'environnement dans lequel ils évoluent ([Blackburn et al. 1999](#), [Peat et al. 2005](#)). Mais chez les organismes invasifs, une sélection spatiale de certaines caractéristiques entre autre liées à la dispersion peut également avoir lieu, c'est l'hypothèse du « spatial sorting » ([Shine et al. 2010](#)). Cette hypothèse évolutive démontre l'évolution particulièrement rapide d'espèces invasives dans leur zone d'invasion dans le temps et l'espace, favorisant leurs capacités dispersives sur les fronts d'invasion. Cette hypothèse a été vérifiée par exemple chez *Tetrix subulata* (Orthoptera, [Berggren et al. 2012](#)); *Harmonia axiridis* (Coleoptera, [Lombaert et al. 2014](#)); *Megacopta cribraria* (Coleoptera, [Basili & Merwin 2016](#)), et *Callosobruchus maculatus* (Coléoptera, [Ochoki & Miller 2016](#)). Sur les fronts d'invasion, les populations sont donc plus exploratrices, et développeraient des capacités et des comportements de dispersion plus élevées ([Alford et al 2009](#), [Brown et al. 2014](#)). Dans les zones les plus anciennement envahies, la densité de population étant plus élevée pourrait entraîner une augmentation locale de compétition intra-spécifique : l'hypothèse d'une sélection d'individus plus fertiles dans ces zones est posée dans notre étude.

Les vespides ont un cycle de développement annuel avec deux phases de dispersion : la première à l'automne lorsque les jeunes reines quittent leur nid pour se reproduire et trouver un site d'hibernation ; la deuxième au printemps quand ces jeunes reines sortent d'hibernation et partent trouver un site pour fonder leur colonie ([Matsura & Yamane 1990](#)). Une fois une colonie fondée, elle ne sera que rarement déplacée dans un site plus adapté à son développement ([Nakamura & Sonthichai 2004](#)). La dispersion des vespides repose donc essentiellement sur les capacités dispersives propres

des reines à l'automne ou durant l'hiver et sur les ressources disponibles pour l'initiation des colonies, mais également du transport passif des reines dans des supports d'hibernation (bois, pots, autres). Concernant *V. velutina*, des reines volant en manège de vol auraient pu parcourir plusieurs dizaines de km (INRA Orléans, unpublished data). Les reines de vespides conservent des spermatozoïdes dans leur spermathèque après s'être accouplées à l'automne, et utilisent ce stock tout au long de l'année suivante pour la fertilisation des œufs de femelles (système de reproduction haplodiploïde) (Matsuura, 1991). Les reines ont des réserves de graisse, les corps gras, qui leur serviront à la fois à survivre à l'hivernation, mais également de réserves d'énergie pour leur production d'œufs (Kovacs & Goodisman 2012). La croissance de la colonie, sa population maximum et sa production future de reproducteurs dépendent donc de la fertilité de la reine. Et chez les insectes invasifs, ce paramètre joue également un rôle primordial dans sa dynamique d'expansion (Moller 1996).

Vespa velutina var *nigrithorax* est un frelon prédateur d'abeilles invasif en Europe observé en France pour la première fois en 2004 (Rortais et al. 2010), originaire d'Asie de l'Est (Arca 2015) (voir Monceau et al. 2014a pour une review). Présent maintenant dans plusieurs pays d'Europe de l'Ouest : Espagne (Castro & Pagola-Carte 2010, Lopez et al. 2011), Portugal (Grosso-Silva & Maia 2012), Belgique (Rome et al. 2012), Italie (Demichelis et al. 2012), Allemagne (Orlov 2014) et enfin en Angleterre (Keeling et al. 2017). Ce frelon est une menace pour de nombreux pollinisateurs, et particulièrement pour les abeilles domestiques quand ces dernières sont présentes dans son environnement (Abrol 2006, Tan et al. 2007, Monceau et al. 2013b, c). La forte pression de prédation exercée de manière croissante durant l'été et l'automne sur les ruchers peut affaiblir suffisamment les colonies d'abeilles pour menacer leur survie durant l'hiver (Tan et al. 2007, Monceau et al. 2014a). Connaissant le contexte actuel de déclin des pollinisateurs en Europe lié à de multiples facteurs (perte d'habitat, intensification agricole, changement climatique et pathogènes) (Goulson et al. 2010), la menace que représente *V. velutina* est alors d'autant plus critique pour ce secteur fragilisé. Des modèles de dispersion prédictifs basés sur des conditions climatiques ont été réalisés, et s'avèrent pour l'instant plutôt proches de la réalité (Villemant et al. 2011, Barbet Massin et

al. 2013). Le rôle du transport des frelons par l'homme a également été mis en exergue par plusieurs études, Monceau *et al.* 2014a, Bessa *et al.* 2016 et Robinet *et al.* 2017.

Les paramètres reproductifs et dispersifs sont essentiels à la compréhension et à la gestion de l'invasion de *V. velutina* en Europe. Nous sommes donc en droit de nous demander si une sélection spatiale de ces paramètres s'est mise en place ? Notre étude a donc pour but d'apporter des éléments de compréhension supplémentaires à certaines dynamiques de dispersion de vespidae invasifs dans d'autres contextes (par exemple en Nouvelle Zélande, avec *Vespula germanica* et *V. vulgaris* (Beggs *et al.* 2011)).

L'objectif de cette étude est donc **d'évaluer l'existence d'un compromis entre des paramètres dispersifs et reproductifs chez des reines de *V. velutina* provenant de trois sites envahis depuis plus ou moins de temps en Europe**. Nous posons l'hypothèse dans cette étude qu'une évolution spatiale puisse être détectée chez les reines de *V. velutina*, qui favoriserait des meilleurs traits dispersifs dans les sites les plus récemment envahis, et des meilleurs traits reproductifs dans les sites les plus anciennement envahis. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé dans cette étude 388 fondatrices provenant de trois zones géographiques différentes, la première envahie depuis 1-2 ans (Ligurie, Italie), la deuxième depuis 5-6 ans (Bretagne, France), et la troisième envahie depuis 11 ans (Aquitaine, France). Nous avons comparé certains de leurs paramètres dispersifs (taille, poids, taille des ailes) et reproductifs (développement ovarien, stock de spermatozoïdes, réserves de corps gras).

Matériel et méthodes

➤ Collection des reines

Pour capturer vivantes des fondatrices de *V. velutina*, des pièges alimentaires ont été fabriqués selon la recette classique utilisée par de nombreux apiculteurs (piège bouteille avec nasse en haut, ~5ml sirop de fruits rouges, ~15ml bière brune, une éponge anti-noyade). De cette manière, de mi-mars à mi-juin 2016, 251 fondatrices ont été capturées en Aquitaine, 90 en Bretagne et 47 en Italie (Figure 31).

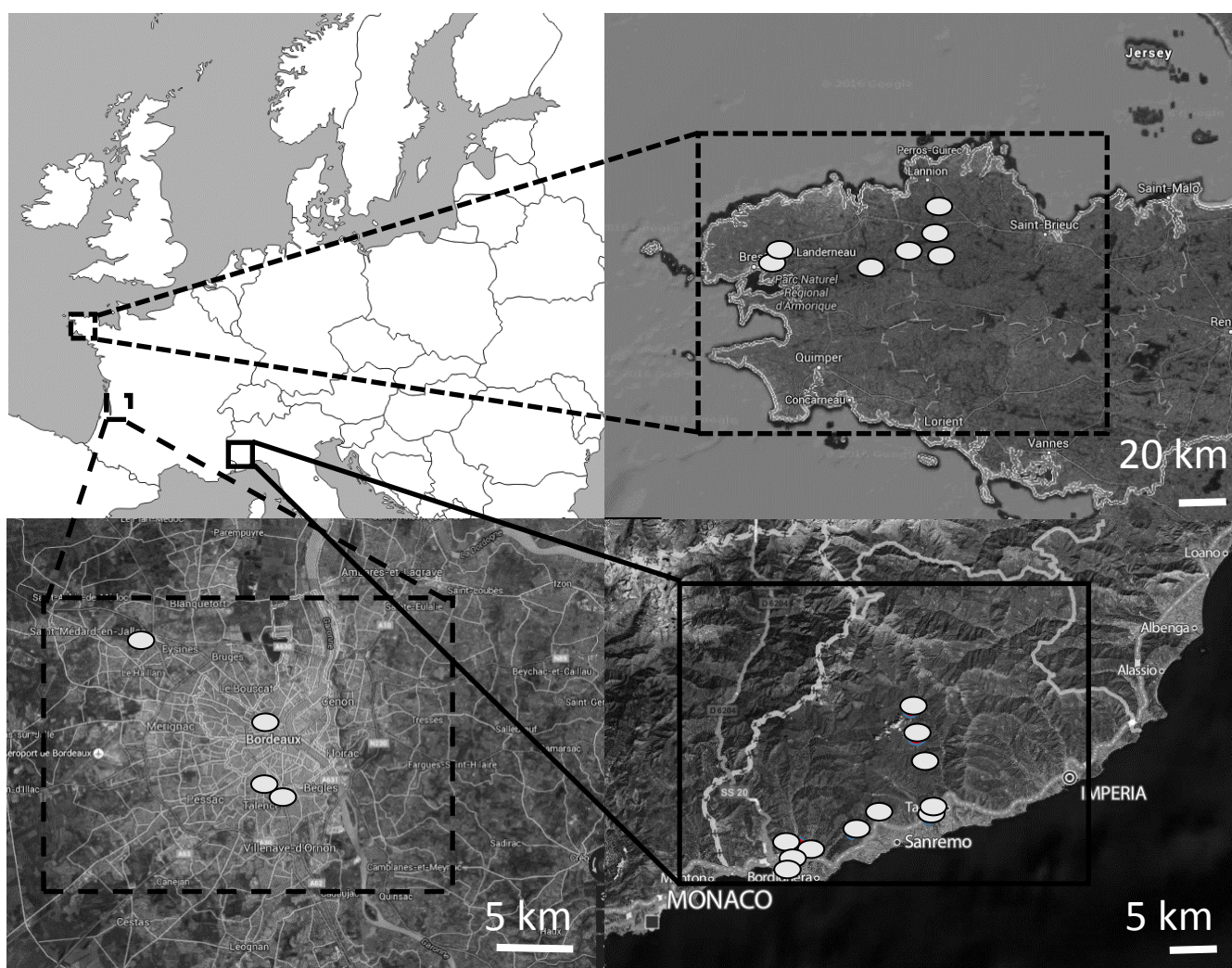


Figure 31 : Localisation des différents sites de d'échantillonnage de fondatrices de *V. velutina*. Chaque cercle correspond à un site de piégeage, où 1 à 3 pièges ont été placés.

➤ Mesures

Toutes les mesures ont été réalisées sur des insectes fraîchement tués, placés au congélateur pendant 30min avant dissection. Les fondatrices capturées en Aquitaine ont pu directement être disséquées après capture, les équipements nécessaires pour cela y étant disponibles (INRA, Villenave d'Ornon) ; mais celles capturées en Bretagne et en Italie ont passé de quelques jours à deux semaines dans un réfrigérateur (4°C) avant dissection. Cinquante reines à Bordeaux ont également été conservées dans les mêmes conditions, et il semblerait que ce traitement n'affecte pas les traits observés ici. Les mesures ont été réalisées à l'INRA UMR 1065 SAVE pour les fondatrices bretonnes

et bordelaises, et au département de biologie de Sesto Fiorentino (Florence) pour celles capturées en Ligurie.

➤ Paramètres morphologiques

Le poids frais total des fondatrices a été mesuré avec une balance électronique de précision (en France : Radwag, Poland, $e=0.1\text{mg}$). Puis afin de mesurer l'investissement relatif dans des muscles de vol, le thorax et l'abdomen sont pesés séparément, après avoir découpé soigneusement les appendices (ailes, pattes) à leur base avec un ciseau de précision (Figure 32).

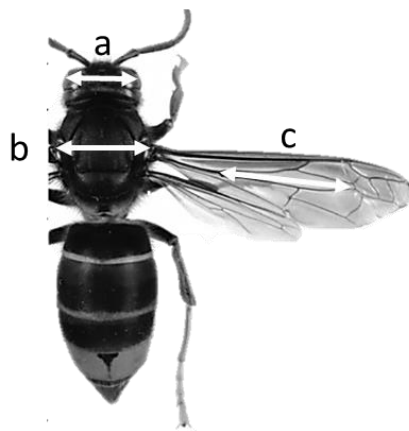


Figure 32 : Mesures morphologiques réalisées sur les reines de *Vespa velutina*. (a) largeur de la tête, (b) distance inter allaire et (c) largeur de la cellule médiane.

Plusieurs mesures de taille ont été réalisées avec un pied à coulisse électronique : la largeur de la tête au point le plus large, qui est un bon indicateur de taille chez les hyménoptères (Beani *et al.* 2011), et la largeur du thorax i.e. la distance entre les deux ailes, qui est un bon indicateur des capacités dispersives chez les hyménoptères (Greenleaf *et al.* 2007). Les ailes ont été soigneusement détachées du thorax avec des micro-ciseaux, puis ont été étalées entre deux lames de microscope pour les aplanir, comme décrit dans les travaux de Perrard *et al.* 2012. Puis une photo de chaque aile a été prise après grossissement à la loupe binoculaire (x1.5), permettant grâce au logiciel d'analyse d'images Image J (version 1.51) de mesurer la longueur de la cellule médiane de chaque aile. Cet indice est classiquement utilisé pour comparer des longueurs d'ailes, car il est proportionnel à la taille totale des ailes mais ne dépend pas de l'état de ces dernières (abimées ou raccourcies) (Beani *et al.* 2011).

➤ Paramètres physiologiques

L'abdomen des fondatrice est isolé, fixé face dorsale à l'aide d'épingles entomologiques sur un support de dissection immergé dans du liquide de Ringer. Après avoir ouvert l'abdomen sur la face ventrale avec des micro-ciseaux, les sternites ont soigneusement été détachés de l'abdomen avec des pinces de précision (55, Dumont, Suisse), et tout au long de la dissection, les fragments de corps gras fixés sur les sternites et tergites ont été collectés et placés dans une coupelle référencée, pesée vide au préalable. Une fois les corps gras entourant les ovaires extraits, des photos du tractus reproducteur total et de chaque ovaire ont été réalisés. La longueur de deux œufs a ensuite été rapportée à celle de sa cellule nourrice correspondante. Avec des pinces de précision, les organes ont été sortis de l'abdomen, ainsi que les restes des corps gras (sur les tergites, sternites, et autour du tractus reproducteur) qui seront ajoutés au reste de corps gras dans la coupelle. La couleur et texture de ces réserves de graisse, blanches-crème, permet de les distinguer facilement des organes.

Le comptage des spermatozoïdes a suivi le même protocole que décrit dans [Poidatz et al. 2017](#). La spermathèque a été extraite du tractus avec des pinces de précision, et placée dans une goutte de liquide de Ringer sur une lame de microscope. Une photo a été réalisée avec grossissement à la loupe binoculaire. L'enveloppe externe de la spermathèque a alors été enlevée, le réservoir percé et les spermatozoïdes contenus étalés de manière homogène dans la goutte, en tournant lentement et délicatement la pointe d'une pince ouverte dedans pendant au moins 30 secondes. La solution une fois sèche a été fixée à l'éthanol, puis l'ADN (principalement contenu dans les noyaux des spermatozoïdes) a été coloré avec du DAPI. Le comptage des spermatozoïdes a été réalisé avec un microscope à fluorescence (x100). Le nombre de noyaux (entiers ou coupés) visibles a alors été mesuré, et rapporté à la surface totale de la goutte, mesurée avec la formule de l'ellipse ($R1 \times R2 \times \pi$).

➤ Création des indicateurs

Grace aux différentes mesures réalisées, nous avons pu créer différents indicateurs de traits reproductifs et/ou dispersifs (résumés dans le tableau 2).

Tableau 2 : Calcul des différents indicateurs dispersifs et reproductifs.

	Largeur du thorax / largeur de la tête	poids frais thorax / poids frais total	largeur de la tête	Longueur moyenne des cellules médianes 2 ailes / largeur de la tête des	Poids sec de corps gras / poids frais total	Nombre de spermatozoïdes dans la spermatèque	Poids frais
Dispersif	X	X	X	X			X
Reproductifs			X		X	X	X

➤ Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.3.0). Un test de Shapiro-Wilk a été réalisé sur les données pour tester leur normalité, et en déduire le type de test statistique à appliquer pour mettre en évidence leurs différences. Les lettres ‘a’, ‘b’, et ‘c’, associées avec les box plot représentent les différences et leur ordre relatif suite à un test de Tuckey. Par exemple, ‘a’ et ‘b’ sont différents significativement, et ‘a’ a une valeur supérieure à ‘b’ pour le trait étudié.

Résultats

Les comparaisons des différents indicateurs sont représentées en Figure 33. Le poids relatif du thorax est supérieure chez les fondatrices de Ligurie comparées aux Françaises, mais elles sont plus petites (indice taille de la tête), plus légères, et ont de plus petites ailes. Concernant la masse grasseuse, la largeur du thorax et le nombre de spermatozoïdes stockés, les fondatrices de Ligurie en ont respectivement plus, sont plus larges et en stockent plus, suivies par les fondatrices de Bordeaux puis celles de Bretagne.

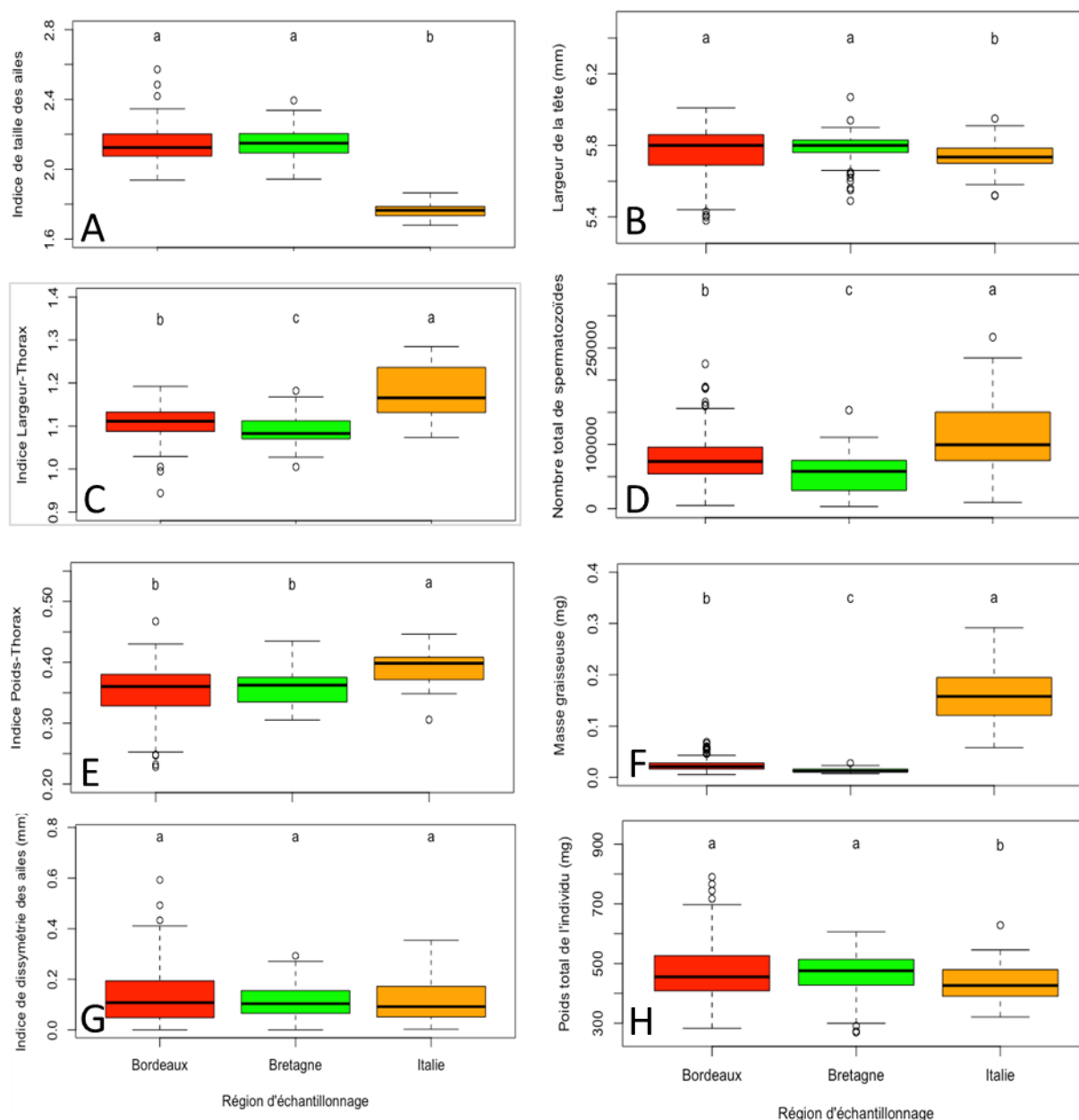


Figure 33 : Box plots représentant les comparaisons des différents indicateurs entre les reines de *V. velutina* provenant de Bordeaux (rouge), de Bretagne (vert) ou de Ligurie (orange), pour différents indicateurs. A : Indice de taille de cellule médiane, B : Largeur de la tête, C : Indice de distance inter-alair, D : quantité de spermatozoïdes, E : Indice de poids du thorax, F : Indice de masse de corps gras, G : Indice de dissymétrie des ailes and H : Poids frais total.

Pour résumer:

Indicateurs		Aquitaine (Mean $\pm$ SD)	Bretagne	Ligurie
Dispersif	Indice cellule médiane	2.12 $\pm$ 0.14 a	2.04 $\pm$ 0.35 a	1.76 $\pm$ 0.03 b
	Indice largeur thorax	1.11 $\pm$ 0.03 b	1.09 $\pm$ 0.03 c	1.18 $\pm$ 0.05 a
	Indice poids thorax	0.35 $\pm$ 0.03 b	0.35 $\pm$ 0.02 b	0.39 $\pm$ 0.02 a
Reproductif	Nombre spermatozoïdes ($\times 10^3$)	79.36 $\pm$ 37.29 b	57.66 $\pm$ 32.61 c	113.99 $\pm$ 60.86 a
	Indice poids corps gras ($\times 10^{-2}$)	2.4 $\pm$ 1.2 b	1.4 $\pm$ 0.5 c	16.4 $\pm$ 6.2 a
Les deux	largeur tête (mm)	5.76 $\pm$ 0.13 a	5.78 $\pm$ 0.08 a	5.73 $\pm$ 0.09 b
	poids frais total (mg)	473.7 $\pm$ 90.6 a	464.3 $\pm$ 78.41 a	435.1 $\pm$ 61.9 b

Discussion

Nous présentons ici la première étude soulevant la question d'une potentielle évolution de traits morphologiques et physiologiques du frelon invasif en Europe *V. velutina* dans son aire d'invasion. A travers l'étude de différents traits liés soit à la dispersion, soit aux capacités reproductrices de fondatrices de cette espèce entre trois zones envahies depuis plus ou moins de temps par cette espèce, nous avons pu mettre en évidence de grosses différences dans ces paramètres.

D'une manière intéressante, les fondatrices italiennes sont statistiquement différentes des françaises pour tous les paramètres étudiés.

Morphologie

Les fondatrices italiennes sont plus petites et plus légères que les françaises. Les ailes des fondatrices sont significativement plus courtes chez les italiennes, comparées aux ailes des fondatrices bretonnes et aquitaines, de tailles similaires. Les fondatrices italiennes ont un thorax significativement plus large et plus lourd, suivi des bordelaises puis des bretonnes. Cela peut être attribué à une masse musculaire thoracique plus importante qui pourrait être liée à une activité de vol plus importante (Tiegs 1955, Marden 2000). Toutefois leurs ailes étant plus petites, les capacités de vol devront être étudiées plus en détail. > *quelle est l'implication d'avoir des ailes plus courtes sur la dispersion ? cette différence peut-elle être compensée par la présence de plus de muscles ?*

Capacités reproductrices

Nous avons observé plus de spermatozoïdes stockés dans la spermathèque des reines de Ligurie que dans celles d'Aquitaine, elles-mêmes en ayant plus que les bretonnes. Cela peut être lié à un nombre d'accouplements plus élevé ou un même nombre d'accouplements avec des mâles plus fertiles, ou encore la présence dans l'environnement de meilleurs sites de reproductions ou de ressources favorisant la fertilité des reproducteurs. Le nombre de spermatozoïdes ne peut pas être déconnecté de la capacité de production d'œufs à féconder pour estimer la réelle fertilité d'une femelle (Cini et al. 2013). Dans notre cas, en début de saison, les indices ovariens ne sont que peu indicatifs quant à la potentielle capacité de production d'œufs, les ovaires commençant juste leur maturation (Makino 2016). Mais les corps gras, constitués généralement de glycogènes et servant dans l'hibernation et la

fabrication des œufs (Strohm 2000, Weissel *et al.* 2012), étaient également plus importantes chez les liguriennes comparées aux bordelaises, qui en possèdent plus que les bretonnes. On pourrait supposer soit que les reines sont mieux nourries dans leurs nids avant leur vol nuptial grâce à de meilleures ressources (Martin 1993), ou que les réserves sont moins utilisées durant l'hivernation grâce à des conditions peut-être plus favorables, ou au contraire que les reines avec peu de réserves n'arrivent pas à survivre dans ces conditions, ce qui ne sélectionnerait que les plus grasses. On peut supposer que ces corps gras en grande quantité pourront être utilisés pour fabriquer d'autant plus d'œufs, et fourniront aux reines plus d'énergie pour la collecte de ressource et la défense de leur colonie, en particulier durant la phase d'initiation du nid durant laquelle elles doivent assurer seules toutes les tâches.

De nombreuses différences sur plusieurs indicateurs pouvant avoir des conséquences importantes sur la dispersion et la reproduction et donc sur les dynamiques invasives de *V. velutina* dans trois régions envahies plus ou moins tardivement ont ici été mises en évidence. Aucune similitude n'a pu être observée entre les deux zones les plus récemment envahies, la Ligurie et la Bretagne, cette dernière s'avérant être plus proche de l'Aquitaine. Mais l'interprétation des causes sous-jacentes ayant entraîné ces différences reste ici difficile à établir. En effet l'évolution spatiale de certains traits pourrait ici avoir été modifiée par des effets environnementaux (climat, ressources) (Garnas *et al.* 2016). Il faudrait pouvoir accéder à des populations provenant de ces zones un an après un séjour en conditions similaires, ou travailler à plus grande échelle dans l'échantillonnage pour trancher sur ces questions. L'étude de la variabilité de certains SNP's (Single Nucleotide Polymorphism) permettrait également de visualiser des potentielles pressions de sélections, qui pourront être connectées à certains traits, et permettre la visualisation de potentiel transport passif de certaines populations. Les individus étudiés par Arca *et al.* 2012 ayant été échantillonnés entre 2008 et 2009, il serait également possible avec l'étude de SNP's d'évaluer l'existence d'une potentielle ré-invasion de *V. velutina* en Europe depuis cette date.

Afin d'obtenir un échantillonnage le plus vaste et exhaustif possible, un réseau de capture à l'échelle Européenne permettant une comparaison par zone climatique de frelons issus de zones plus ou moins récemment envahies a été créé (Voir Annexe 1.2).

*ANNEXE 1.2: Sélection spatiale chez *Vespa velutina* : Projet EUROFRELON : Evaluation d'une potentielle sélection spatiale chez *V. velutina* en Europe*

Juliette Poidatz, Mathieu Lihoreau, Antoine Wystrach, Denis Thiéry.

Introduction

Nous avons montré dans l'étude précédente que des différences morphologiques et physiologiques liées aux capacités reproductives et dispersives de *V. velutina* existent entre différentes régions plus ou moins anciennement envahies. Mais la taille de l'échantillonnage rendant l'interprétation évolutive impossible dans cette étude, le protocole présenté ci-après s'appliquera à étudier des traits dispersifs par zone climatique. Dans chaque zone, nous allons comparer des échantillons provenant de zones à la fois anciennement envahies ou nouvellement envahies

Une collaboration avec des chercheurs du CNRS de Toulouse, Antoine Wystrach et Mathieu Lihoreau, (Research Center on Animal Cognition (CRCA), Center for Integrative Biology (CBI)), a été initiée afin de réaliser cette étude.

L'étude de [Garnas et al. 2016](#) a montré que dans une majorité des cas d'invasions réussies, on observait fréquemment des **introductions multiples**, des **mouvements complexes globaux** ainsi que des **mélanges de populations** de façon simultanée. A l'aide d'un **volet génétique**, nous pourrions à la fois détecter la présence de pression de sélection potentielle sur certains caractères liés à la dispersion du frelon en Europe, mais également détecter une potentielle réintroduction.

Matériel et méthodes

➤ Constitution du réseau Eurofrelon

Nous avons envoyé des demandes de capture de fondatrices de frelons à des publics variés, mais principalement à des personnes « averties » : apiculteurs amateurs ou non, associations de lutte contre le frelon, chercheurs entomologistes, entreprises concernées. Le relais aux particuliers a été fait grâce à des articles et interviews à ce sujet (www.salamandre.net, www.sfecologie.org, , www.apiservices.biz, www.apiculteurs63.fr, <https://ruchersduplessis.wordpress.com>, <http://apicantal.fr>,

<http://www.gdsa21.fr>, <http://ephytia.inra.fr>, <http://www.saco21.fr/>, <http://www.tela-botanica.org>, <http://www.sudouest.fr>, bioinsecte, apiliguria, sat37.fr ...).

➤ Site internet

Afin d'y héberger toutes les informations nécessaires aux participants pour effectuer leur échantillonnage et leur envoi dans de bonnes conditions, nous avons réalisé un site internet, <https://sites.google.com/site/eurofrelon/home>, que nous avons traduit en espagnol, portugais, italien, anglais et allemand. Dans ce site, chacun a accès à une description schématique du projet et de la manière dont il peut y participer, et il peut consulter plusieurs fiches : un flyer sur le fond scientifique vulgarisé de ce projet, un protocole de piégeage assez sélectif (piège nasse, appât alimentaire, perforations de différents gabarits à l'entrée et sur les côtés du piège, éponge etc), des fiches d'identification, et des articles vulgarisés sur le frelon asiatique et son impact.

Un fichier google.doc connecté permet aux gens qui le souhaitent de se pré-inscrire et de géolocaliser leurs pièges en ligne.

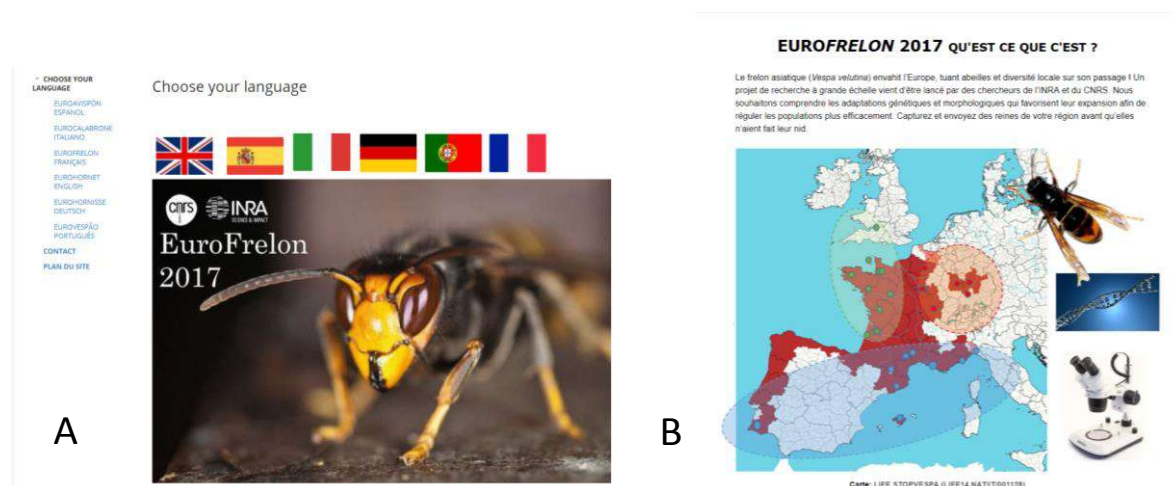


Figure 34 : A : Page d'accueil avec choix des langues pour le site internet Eurofrelon. B : Fiche vulgarisée du principe scientifique du projet, disponible sur le site internet.

➤ Conservation des insectes.

Les reines capturées par les différents participants sont conservées au congélateur (-20°C) après réception.

Analyses prévues : mesures morphologiques (taille de la tête, distance inter-alaire, surface des ailes, poids sec), et analyses génétiques (SNP's).

Premiers résultats

Le réseau de collecte mis en place a permis l'obtention de plus de **6000 fondatrices**, provenant en grande majorité de France, ainsi que quelques fondatrices provenant d'Espagne, du Portugal et d'Italie (Figure 35 ci-dessous).

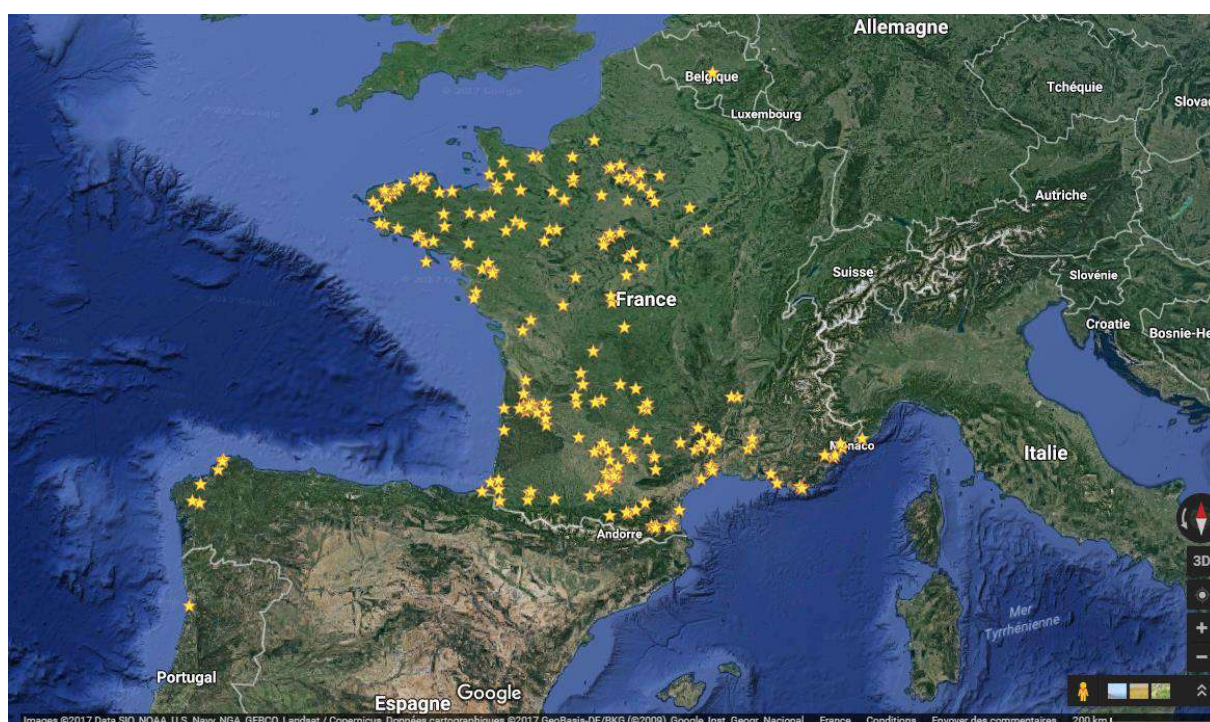


Figure 35 : Origine des plus de 6000 fondatrices récoltées grâce à la campagne Eurofrelon au printemps 2017.

ANNEXE 1.3. Describing the mating behavior of *Vespa Velutina*, in laboratory conditions.

J. Poidatz, K. Monceau, D. Thiéry

Introduction

La reproduction chez les hyménoptères sociaux ne concerne que des castes particulières, les moins nombreuses : les mâles et les reines. Suivant les espèces, ces derniers vont s'accoupler plus ou moins de fois dans leur vie (Baer 2014, Page & Metcalf 1982). Chez les vespides, la qualité de la fertilisation des reines est essentielle à la croissance future de la colonie, car elle n'a lieu qu'une seule fois dans la vie de l'insecte, à l'automne, avant l'hibernation des jeunes reines et la création d'une colonie l'année suivante (Matsuura & Yamane 1990). Ces insectes étant haplodiploïdes, le stock de spermatozoïdes que la reine constitue lors de sa reproduction lui permettra de fertiliser ses œufs et ainsi de pouvoir produire des ouvrières, qui œuvrent pour la croissance et le développement de la colonie (Cole 1983, Chevrier & Bressac 2002).

La maturation sexuelle peut être évaluée de différentes manières, soit anatomique ou physiologique (par exemple Poidatz *et al.* 2017), mais elle reste indissociable du comportement de reproduction (Heidinger *et al.* 2014). En effet, si individu peut être potentiellement capable de se reproduire, l'accouplement ne pourra avoir lieu que si le partenaire est réceptif à l'accouplement (Baer 2014). Différents paramètres peuvent rendre des individus attractifs, soit par leur niveau de fertilité, leur taille, leur coloration, leur proximité génétique, ou la présence de concurrents dans l'environnement (Crozier & Page 1985, Crozier & Fjerdingstad 2001).

Vespa velutina est un prédateur invasif d'abeilles introduit accidentellement en France vers 2004, et dont l'aire d'invasion s'étend maintenant à travers l'Europe (Monceau *et al.* 2014a). Ce frelon a la particularité de faire des colonies très populeuses, et des études assistées par l'analyse de marqueurs moléculaires ont mis en évidence le fait que les reines étaient capables de se reproduire en moyenne 2.4 fois, ce qui est au moins deux fois plus que toutes les autres espèces de frelons étudiées jusqu'alors (Foster *et al.* 1999). Poidatz *et al.* 2017 ont montré que les mâles de *V. velutina* possédaient des

spermatozoïdes en large excès comparé à la contenance de la spermathèque des reines. De plus, le stock de spermatozoïdes des fondatrices de *V. velutina* au printemps est deux fois plus important que celui de son cousin, *V. crabro*, au même stade (Poidatz *et al.* in prep). Ce fort investissement dans des traits reproductifs optimaux est un paramètre intimement lié au caractère fortement invasif de cette espèce en Europe, permettant une pullulation et une dispersion plus rapide de l'espèce (Moller 1996).

De nombreuses stratégies de contrôle de la reproduction d'insectes ravageurs existent (Harvey 2015), soit en attirant l'un des deux sexes avec des pièges à phéromones, par exemple le Z11-hexadecenal, E11-hexadecenal attire les mâles de *Cydalima perspectalis* (pyrale du buis) (Martin *et al.* 2015) ; soit en perturbant la reconnaissance entre les partenaires via l'utilisation de méthodes de confusion sexuelle, par l'utilisation massive de phéromones femelle dans la zone à protéger, par exemple la lutte contre *Lobesia botrana* (tordeuse de la grappe sur vigne) (Schmitz *et al.* 1995, Ioriatti *et al.* 2011).

On ne connaît pas encore où et comment se déroule la reproduction chez *V. velutina*. Chez d'autres frelons, les accouplements ont été observés dans les nids et à leur proximité (*V. mandarinia* par exemple (Matsuura & Sakagami 1973)), ou sur des sites de nourriture où les mâles patrouillent en bandes (*V. crabro*, Spiewok *et al.* 2006). Afin de pouvoir perturber la reproduction du frelon invasif *V. velutina*, il faut d'abord pouvoir observer un accouplement complet, le décrire et le comprendre. De telles informations seront d'un grand intérêt pour la compréhension de la biologie de *V. velutina*, pour son contrôle, et pour leur intégration dans des modèles de dispersion et d'impact.

Dans cette étude nous avons tenté d'explorer les paramètres rentrant en compte dans le comportement de reproduction du frelon asiatique *V. velutina*, en observant ce comportement dans trois situations différentes, plus ou moins artificielles : (1) en couple, (2) reine fixée, plusieurs mâles, et (3) reine libre et plusieurs mâles.

Matériel et méthodes

1. En couples

1.1 Insectes

Nous avons collecté quatre nids de *V. velutina* dans la région de Bordeaux (France) à l'automne 2014. Les galettes portant le couvain ont alors été isolées dans des boîtes grillagées, dans une armoire climatique sans lumière à 23°C. Les émergés étaient récupérés deux fois par jour, et placés par sexe et nid par groupes de 10 maximum dans des boîtes grillagées avec eau et miel à volonté, dans une armoire climatique à 23°C, 12h /12h lum. L'âge et l'origine de chaque individu était alors recensé.

Dans cette expérimentations, 33 couples ont été testés (Nid 1 : N=14 ; nid 2 : N=16, nid 3 N=28, nid 4 N=10).

1.2 Expérimentation

Nous avons utilisé cinq arènes d'expérimentation, faites de plexiglass transparent (10x10x10cm), avec une entrée aménagée sur le côté sur laquelle un tube Falcon® (50 ml), servant de sas, peut se fixer. Un clapet entre le sas et l'enceinte permet à l'expérimentateur de connecter les deux espaces (Figure 36).

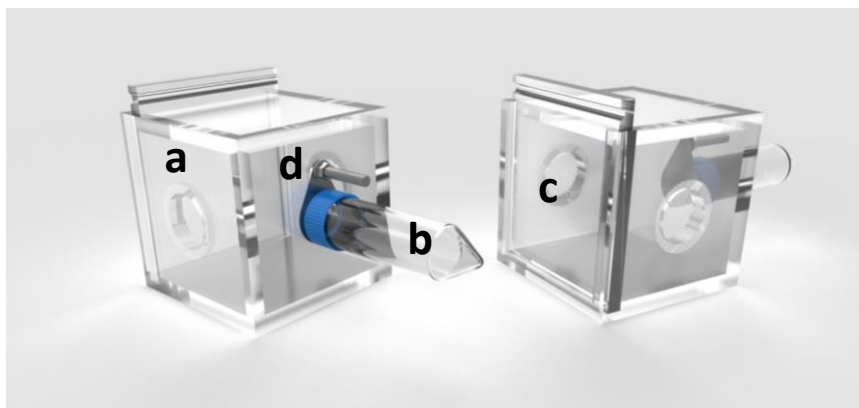


Figure 36 : Structure des enceintes expérimentales : a : boîte en Plexiglass® 10x10 cm ; b : tube Falcon 50ml; c : porte coulissante en Plexiglass ®; d : loquet. (Système de J. Poidatz, réalisé avec C. Lacoste, Image par M. Poidatz).

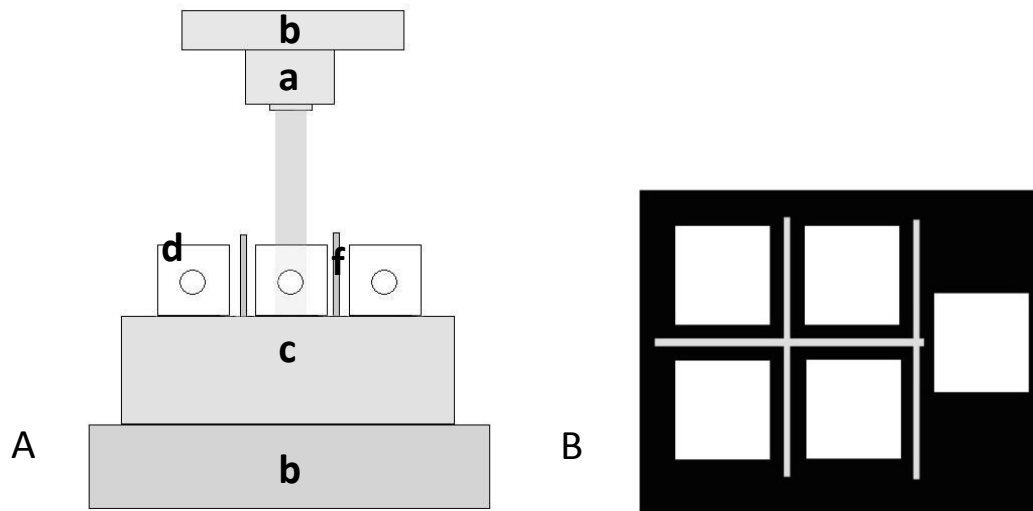


Figure 37 : Schéma de l'installation expérimentale. A: vue de côté, B : vue de dessus. a : camera, b : banc photo, c: Negatoscope, d: enceintes expérimentales contenant les couples, e: cache en plastique noir, f : parois de carton. (Schémas J. Poidatz)

Les essais ont été réalisés dans la période d'activité la plus élevée chez *V. velutina*, soit entre 10h00 et 15h00 (Monceau *et al.* 2013c), dans une pièce climatisée à 24°C sans lumière. Chacune des cinq reines vierges était placée dans une enceinte expérimentale (Figure 36) disposée sur le négatoscope¹ allumé aménagé avec des caches noirs entre chaque (Figure 37). Le négatoscope permet une illumination des enceintes par le bas, ce qui attire le mâle dans le sas de la femelle, et incite les individus à se déplacer sur le fond de la boîte au lieu des parois, rendant ainsi les analyses vidéo plus aisées. Après 10 minutes d'acclimatation, cinq mâles d'âges et de colonies différentes ont été choisis aléatoirement et placés individuellement dans des tubes Falcon® de 50ml. Ils ont ensuite été fixés aléatoirement sur l'une des 5 boîtes contenant les reines. Dix minutes après la fixation des mâles, l'enregistrement vidéo de l'expérience à l'aide d'une caméra fixée au-dessus des enceintes grâce à un banc photo commence (camera Nikon D-3100 (Figure 37a)). La porte séparant les couples dans chaque boîte est alors ouverte. L'expérimentateur quitte alors immédiatement la pièce pour ne pas perturber les comportements des couples. Une session d'observation dure 10 minutes à partir de l'ouverture de la communication entre les deux cages.

¹ Un négatoscope est une table éclairante produisant une lumière homogène

➤ Comportements mesurés

Nous avons observé et comptabilisé différents comportements exclusifs² chez les couples de *V. velutina* (Tableau 4). Pour chacun de ces comportements, nous avons mesuré l'occurrence, la durée totale du comportement et le pourcentage de temps que cette durée représente sur le temps total d'observation.

Tableau 4 : liste et description des comportements observés durant l'étude.

Nom du comportement	Description du comportement
Contact antennaire	L'individu touche son partenaire avec ses antennes
Mouvement	L'individu marche ou vole
Toilette	L'individu se nettoie avec ses pattes et / ou mandibules
Immobilité	L'individu reste immobile
Hostilité	L'individu poursuit et/ou attaque son partenaire
Tentative de reproduction	Le mâle poursuit la femelle, tente de lui grimper sur le dos pour s'accoupler
Copulation	Le mâle réussit à fixer ses pièces génitales à celles de la femelle, il vibre ses ailes et tapote la tête de la femelle avec ses antennes

Nous avons également mesuré la latence au premier contact pour chaque couple, associé au premier comportement observé (tentative de reproduction, contact antennaire ou agressivité par exemple).

2. Plusieurs mâles en présence d'une reine

Afin d'observer un possible volet social de la reproduction chez *V. velutina*, nous avons dans un second temps effectué un essai où une reine était immobilisée dans une enceinte, et où plusieurs mâles étaient présents en liberté, tel que décrit par Ono *et al.* (1985) sur *V. Mandarinia*. Dans leur étude, la reine est attachée à une tablette lumineuse à l'aide d'un fil de nylon, et plus d'une vingtaine

² **Comportements exclusifs** : comportements ne pouvant pas être réalisés en même temps (par exemple marcher et être assis)

de mâles peuvent tenter de l'approcher. Nous avons adapté ce protocole, en plaçant notre enceinte expérimentale sur un négatoscope, en fixant la reine à un support et en proposant 10 mâles.

2.1 Insectes

Nous avons collecté trois nids de *V. velutina* dans la région de Bordeaux à l'automne 2013. Les galettes de couvains étaient maintenues dans des boîtes grillagées à 24°C à l'obscurité. Les frelons émergés étaient récupérés deux fois par jour, et placés par sexe et nid par groupes de 10 maximum dans des boîtes grillagées avec eau et miel à volonté, dans une armoire climatique à 23°C, 12h /12h lum. L'âge et l'origine de chaque individu était recensé.

2.2 Principe expérimental

L'arène d'expérimentation était une cage de 25 x 25 x 25cm en plexiglass transparente, avec une grille d'aération de chaque côté (10 x 5cm), et une porte coulissante en plastique à l'avant. Après l'avoir désinfectée à l'alcool et aérée, dix mâles provenant des différents nids ont d'abord été installés dans cette arène, après avoir été individualisés à l'aide de taches de peinture sur leur thorax et ou leur abdomen ((Decopainter matt, Marabu). Ils avaient accès à volonté à de l'eau et du miel. L'arène était placée sur un négatoscope, et après une période d'acclimatation d'une heure, pour tester son potentiel attractif, nous y avons introduit une reine vierge maintenue en contention afin de l'empêcher de se déplacer dans l'enceinte et de limiter des comportements agressifs envers les mâles (Figure 38A,B). Le support en question était un couvercle de tube de Falcon® percé de deux trous par lesquels un lien de métal pouvait être inséré, qui venait se glisser au-dessus du pédoncule³ de la reine, de manière à la maintenir sur son support (Figure 38B). Avec ce dispositif, la reine est toutefois libre de bouger ses pattes, ses ailes, son thorax et son abdomen aisément. Nous avons même observé à plusieurs reprises des cas où les reines mordaient des mâles un peu trop aventureux. Grâce à cette méthode, l'expérimentateur pouvait placer la reine au même endroit précisément pour chaque essai, l'orienter et la retirer de l'enceinte quand nécessaire, et observer les comportements facilement. L'expérimentation s'est déroulée dans une pièce climatique à 24°C, sans autre lumière que celle provenant du

³ Le pédoncule correspond au premier segment de l'abdomen qui le relie au thorax, aussi appelé « taille de guêpe »

négatoscope sous l'arène. De manière à ce que le seul éclairage provienne du fond de l'enceinte expérimentale et y attire les individus, un cache noir était placé sur le négatoscope autour de celle-ci.

Les comportements ont été recensés directement par l'observateur pendant 30 minutes : nombre d'antennations, tentatives d'accouplement, accouplements et leur durée.

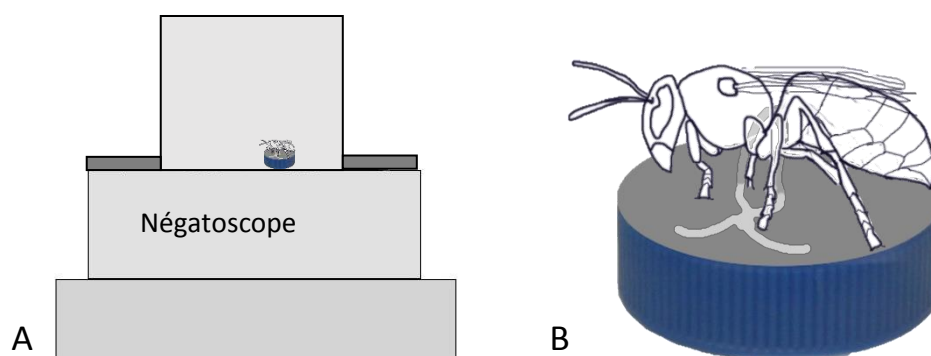


Figure 38 : Schéma de l'installation expérimentale. A : l'enceinte expérimentale contenant les reines sur leur support et les mâles libres est rétroéclairée par le fond par le négatoscope. B : La reine est fixée sur un bouchon de tube Falcon à l'aide d'un lien fermé sous le support (Schémas J. Poidatz).

3. Plusieurs mâles et une reine libre

Cette dernière conformation expérimentale a été réalisée afin de mettre les insectes dans une situation plus naturelle, où une reine est placée dans une grande arène avec plusieurs mâles, libres de se déplacer, et d'accepter ou refuser des accouplements.

3.1 Insectes

Les individus utilisés dans cette expérimentation sont émergés en laboratoire à partir de galettes de couvain maintenues dans des boîtes grillagées dans une armoire climatique à 24°C. Les nids avaient été collectés dans la région de Bordeaux entre 2013 et 2015. Les individus nouvellement émergés ont été collectés toutes les 24h, et placés dans des boîtes grillagées, en groupes de même origine et même sexes, avec de l'eau et du miel à volonté.

3.2 Principe expérimental

Dans une arène (25x25x25cm, décrite précédemment) préalablement désinfectée à l'alcool et aérée, dix mâles marqués de différentes colonies, âges, étaient relâchés. Ils avaient accès à de l'eau et du miel à volonté. Puis une reine vierge était alors relâchée dans l'arène. Les essais étaient réalisés à température ambiante et lumière naturelle. Un temps d'observation de 30 minutes après l'introduction de la reine était appliqué.

4. Dissections

Douze heures après les accouplements observés dans les différentes expérimentations, nous avons disséqué les femelles, afin de valider ou non l'accouplement. Ainsi, nous avons extrait leur spermathèque et avons effectué un comptage des spermatozoïdes potentiellement présents dedans après avoir fixé à l'alcool et coloré au DAPI le contenu des spermathèques (protocole décrit en détail dans [Poidatz et al. 2017](#)).

5. Analyses des données

Le logiciel utilisé pour l'enregistrement et l'analyse des comportements est J. Watcher V1.0. Pour chacune des expérimentations, nous avons recensé l'occurrence et la durée de certains comportements décrits ci-dessus. Les paramètres étudiés étaient l'âge de l'individu, le nid, et l'âge du partenaire. **Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R i386 3.1.2.** Afin de mettre en évidence des corrélations entre certains comportements et les castes, nous avons dans un premier temps effectué des ACP, puis des tests de corrélation avec les traits identifiés (Spearman tests). La normalité des données a été testée avec un test de Shapiro-wilk.

Résultats

En couples

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a permis de mettre en évidence des comportements fortement liés au sexe des individus. Les mâles sont caractérisés par leur mobilité permanente et le nombre de contacts antennaires qu'ils effectuent. Les gynes quant à elles sont plus enclines à l'immobilité, au toilettage et à l'agression des mâles. Ce dernier trait de caractère augmente

avec l'âge des reines (Spearman test, [Figure 39.A](#)). Chez les mâles, le temps passé à être mobile augmente également avec l'âge du mâle (Spearman test, [Figure 39.B](#)). Le temps de latence au premier contact ne dépend pas de l'âge des frelons, et est en moyenne de 59.46 ± 28 secondes après ouverture du loquet d'accès.

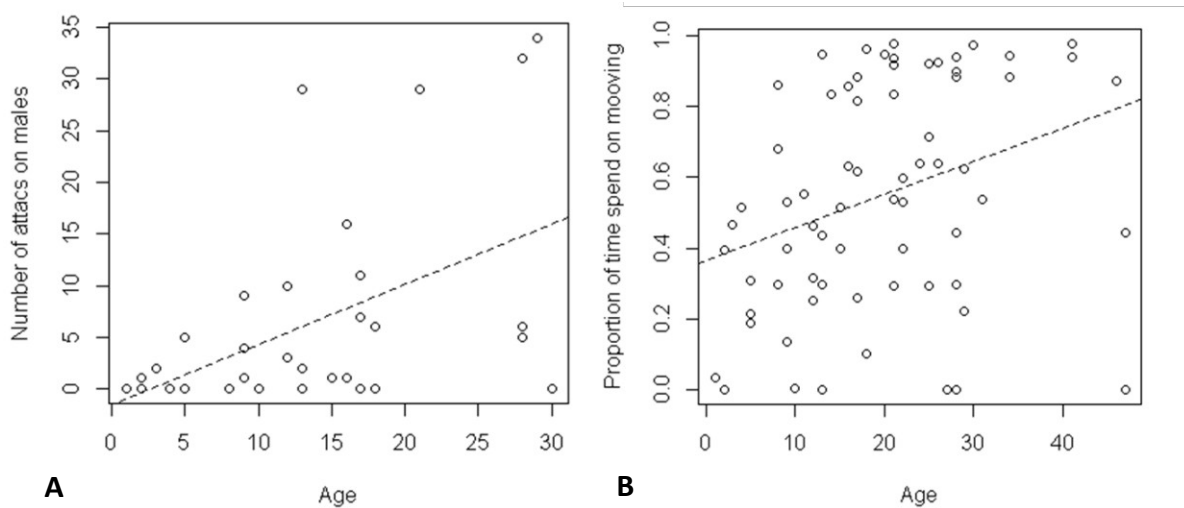


Figure 39 : A : Evolution du comportement agressif des gyne envers le mâle en fonction de l'âge de la gyne. B : Evolution de la proportion de temps passé à se déplacer chez les mâles en fonction de leur âge.

Sur les 33 couples testés dans cet essai, seulement 2 couples ont été observés en train de s'accoupler. Les mâles de ces couples ont passé respectivement 51% (10 tentatives) et 37% (20 tentatives) à tenter de s'accoupler avec la fondatrice, et seulement l'un des deux réussit à fixer ses genitalia, deux fois, pour une durée de seulement 16 secondes.

Toutefois dans ces cas aucune trace de spermatozoïdes dans le tractus de la fondatrice accouplée n'a été observée *a posteriori*. Il existe peut-être un biais dans le principe expérimental ici, où la gyne n'a pas d'autres choix que le mâle qui lui est présenté, et refuse l'accouplement de manière non visible de l'extérieur.

Il serait donc pertinent de pouvoir lui proposer plus de prétendants, pour qu'elle ait un choix et donc plus de chance d'accepter un accouplement, et c'est ce que nous allons tester dans les deux expérimentations ci-après.

Plusieurs mâles et une reine fixée

Avec cette méthodologie, nous avons observé bien plus d'accouplements (30 sur 33 testés). Le nombre et la durée des accouplements ont pu être quantifiés grâce à une analyse vidéo. Lors d'une tentative d'accouplement, les mâles effectuent de nombreux mouvements antennaires et « tapotent » très rapidement la tête et le thorax de la reine. Nous avons pu observer que les reines étaient sujettes en moyenne à plus de 10 accouplements en 30 minutes. Les mâles ont tendance à s'agréger autour de la femelle, et parfois des tentatives d'accouplements de plusieurs mâles sur une même femelle ont pu être observées.

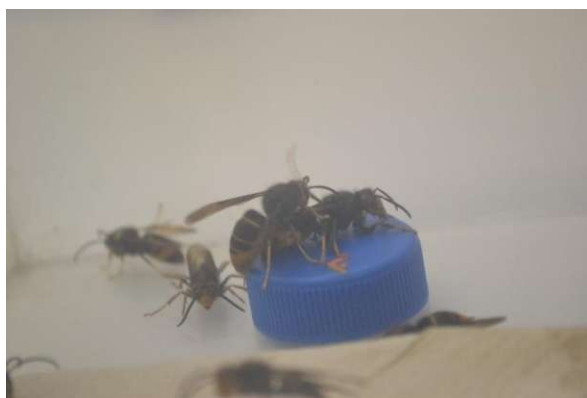


Figure 40 : Tentative d'accouplement d'un mâle sur une gyne fixée.

Malheureusement, pour les répétitions en 2013 nous n'avions pas disséqué les gynes accouplées, et pour celles plus récentes, aucun spermatozoïde n'a également put être observé dans la spermathèque de la femelle, plus de 12h après accouplement.

Nous allons maintenant tester si une reine en liberté ayant un grand choix de prétendant acceptera des accouplements effectifs.

Plusieurs mâles et une reine libre.

Avec cette conformation, nous avons observé un peu moins d'accouplements (4 sur 15 testées), les femelles étant agressives, ou fuyantes. De nouveau des accouplements multiples ont pu

être observés. Le/les mâle(s) « course/nt » la femelle, grimpent dessus et tentent de fixer leurs appendices génitaux tout en tapotant de nombreuses fois leurs antennes sur leur partenaire. Une fois la fixation réussie, le mâle bat des ailes pendant quelques secondes, puis s'arrête et se laisse transporter par la femelle. Un comportement agrégatif des mâles, souvent attirés en groupe par les femelles, a également pu être observé (Figure 41A et 41B).

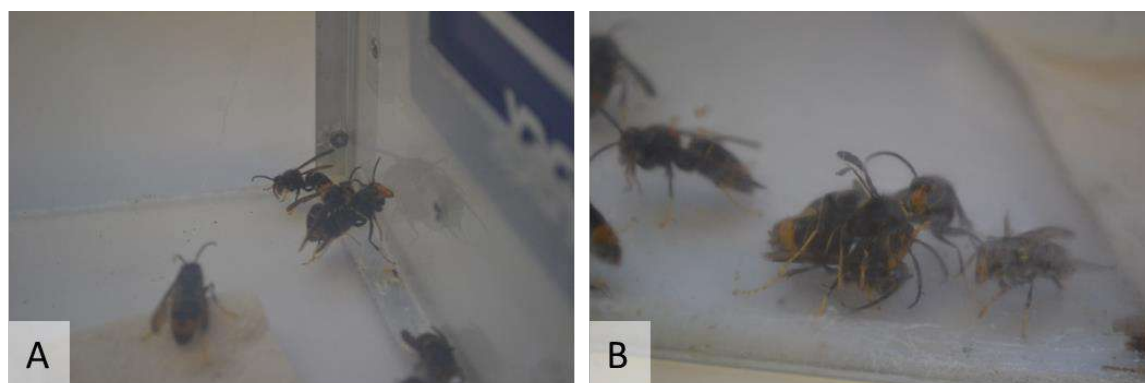


Figure 41 : A : un mâle de *V. velutina* se fait transporter par une gyne pendant son accouplement. B : plusieurs mâles de *V. velutina* s'agrègent autour d'une gyne pour tenter de s'accoupler.

On a remarqué que certains mâles qui s'étaient déjà accouplés étaient attractifs pour certains mâles très excités : nous avons même pu observer une tentative d'accouplement entre mâles.

De la même manière que décrit précédemment, aucun spermatozoïde n'a également pu être observé dans la spermathèque des femelles accouplées, plus de 12h après la tentative.

Discussion

Nous avons dans cette étude tenté de décrire pour la première fois le comportement reproductif du frelon invasif *V. velutina*, à travers trois expérimentations mettant en présence des couples, puis des femelles immobilisées avec plusieurs mâles, et enfin des femelles libres avec plusieurs mâles.

Très peu de tentatives d'accouplement ont pu être observées dans la première configuration, beaucoup dans la deuxième, mais moins dans la dernière : la gyne semble donc être, comme dans chez plupart

des hyménoptères, capable de choisir ses partenaires ([Baer 2014](#)). Malgré l'observation de nombreuses tentatives d'accouplements, nous n'avons pas pu observer d'accouplements « complets », *i.e.* avec transfert de spermatozoïdes dans le tractus femelle. Nous n'avons donc encore trouvé les conditions adaptées à la reproduction de cette espèce. Des observations *in natura* du comportement reproducteur pourraient être ici d'une très grande utilité pour nous permettre d'améliorer les conditions expérimentales.

Le fait que certains mâles deviennent attractifs pour d'autres après avoir tenté de s'accoupler nous portent à croire que les hormones sexuelles d'attraction de *V. velutina* existent bien, sont présentes que sur la cuticule des femelles, ce qui fait écho aux essais de [Batra 2000](#) avec *V. crabro*. De plus, les études de [Couto et al. 2015, 2017](#) ont montré que les mâles de *V. velutina* possédaient des macroglomérules dans leur cerveau, dont le rôle serait justement la détection de telles phéromones.

L'augmentation observée de l'agressivité envers le mâle de la gyne avec son âge est intéressant, et dans une étude sur les bourdons, [Bloch et al. 2000](#) ont mis en évidence un lien entre l'agressivité et la présence de certains acides aminés chez ces insectes: peut-être l'évolution de ce comportement est-il lié à une cause physiologique. On peut également supposer que les gynes plus âgées sont « plus expérimentées » et plus dominantes.

ANNEXE Axe 2



V. velutina sur fleur de bananier. (Photo de MC Dufour).

ANNEXE 2.1 : *Evaluation de la spécialisation pour la collecte d'un type de nourriture chez les ouvrières de Vespa velutina.*

Juliette Poidatz, Salomé Gotreau, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.

Introduction

Les ouvrières de *V. velutina* collectent de nombreuses denrées glucidiques et protéiques issues de sources variées (voir [AXE 2](#)). Comme tous les frelons, cette espèce est plutôt généraliste et adapte son bol alimentaire aux ressources disponibles ([Raveret Richter 2000](#)). Cependant, *V. velutina* a la particularité de chasser les abeilles (domestiques et sauvages) et des guêpes à proximité de leurs colonies ([Matsuura & Yamane 1990](#)). Ces proies étant capables de se défendre, même si de manière inefficace concernant *A. mellifera* ([Arca et al. 2014](#)), leur capture reste une activité dangereuse pour les frelons, à laquelle certaines ouvrières de frelon pourraient se spécialiser. Or les ouvrières de *V. velutina* capturées en chasse devant les ruches sont attirées en laboratoire par les odeurs de la ruche (phéromones de reine ou d'agrégation d'abeille, cire, pollen) ([Couto et al. 2014](#)) : peut-être ces ouvrières sont-elles spécialisées dans la chasse d'abeilles ? En effet les colonies de *V. velutina* atteignant une taille plutôt importante en été, et les individus devenant de plus en plus gros, il semblerait probable que les ouvrières puissent développer au moins à cette période de l'année une certaine forme de spécialisation pour la collecte de certains types de ressources, à la manière de *Polybia occidentalis* ([O'Donnell & Jeanne 1990](#)), *Metapolybia* spp. ou *Protopolybia exigua* ([Simões 1977](#), [Forsyth 1978](#), [Karsai & Wenzel 2000](#)). En effet chez ces espèces, il existe à la fois un polyéthisme très fort lié à l'âge, mais également à l'échelle des individus, qui développent une très forte tendance à se spécialiser pour une ou deux des quatre ressources collectées en groupes fonctionnels: proies ou nectar (nourriture), ou pulpes de bois et eau (matériaux pour le nid).

Afin de différencier une spécialisation d'un opportunisme dans la collecte de nourriture chez *V. velutina*, nous avons capturé dans cette expérimentation des ouvrières de cette espèce venant s'approvisionner sur divers appâts pendant la période où des attaques de leur part sur les ruchers sont

observées. Ces ouvrières de *V. velutina* ont alors été soumises à un test de choix en laboratoire, afin de mesurer leur attirance pour différents items rappelant les sources de nourriture dont elles provenaient. Ainsi, 86 ouvrières de *V. velutina* ont été collectées sur 3 types de ressources de nourriture : des ressources glucidiques végétales (fleurs, fruits) ; des ressources protéiques type carcasses (poisson, crevette, viande) ; et des ressources de type ruche (abeilles, cire, miel), et ont été soumises à un test de choix en conditions contrôlées pour ces mêmes ressources.

Matériel et méthodes

De fin juillet à début août 2016, à l'aide d'un filet à papillon (modèle/dimensions, longueur du manche), des ouvrières frelons ont été capturées sur trois sites de fourragement différents :

- En chasse devant le rucher expérimental de l'INRA Bordeaux-Aquitaine, France (44.787565, -0.577341)
- Sur des appâts de poisson ou de crevette (également sur le site de l'INRA Bordeaux-Aquitaine)
- Sur des fleurs de bananier (Rions, 44.666063, -0.355089)

Dans un souci d'homogénéité comportementale des individus capturés, les sessions ont été effectuées dans la période d'activité principale des frelons, entre 11h et 15h (Monceau *et al.* 2013c). Dans chaque session, cinq ouvrières ont été marquées spécifiquement sur les ailes ou le thorax à l'aide d'un crayon à peinture acrylique (DECO painter matt Acrylmaltstift (Marabu)). Les individus ont ensuite été transférés dans une cage grillagée (60cm x 60cm x 60cm) à l'intérieur d'une pièce climatique, où ils ont été maintenus à une température contrôlée de 24°C pendant 1h avant les essais. Le frelon Européen *V. crabro* ne disposant pas de photorécepteurs sensibles à la lumière rouge (Peitsch *et al.* 1992), nous avons posé l'hypothèse que c'était également le cas chez *V. velutina* (Couto *et al.* 2014). La cage était donc éclairée par une lumière rouge afin de pouvoir observer et filmer sans que les frelons puissent utiliser leur vue durant l'essai.

Après cette période, le tiroir coulissant contenant les items rappelant les différents sites de fourragement et le témoin (papier filtre) a alors été inséré dans la cage (Figure 42). Pour chacune des trois modalités (fleur/fruit, viande/poisson et ruche), 30 individus ont été testés par groupe de cinq, avec six répétitions pour chaque modalité. Un emplacement entièrement aléatoire des différents items dans le tiroir a alors été déterminé grâce à l'utilisation de la fonction Random du logiciel Excel. Entre deux essais, la cage était passée à l'éthanol et aérée au moins une heure. Afin d'éviter de contaminer les items par l'odeur humaine, ces derniers sont préparés sous hotte et manipulés avec des gants en vinyle. Le comportement de chaque ouvrière était enregistré pendant 30 minutes et son attirance pour les différents stimuli olfactifs est mesurée en fonction de deux variables :

- 1) **Le nombre total de visites de frelons sur chaque item au cours de chaque session.** *i.e.* le frelon grimpe sur le rebord de la boîte de Pétri, et touche l'appât avec les antennes.
- 2) **La durée totale de la visite.** La somme de toutes les durées de séjour individuel effectué par les frelons au cours de cette session.

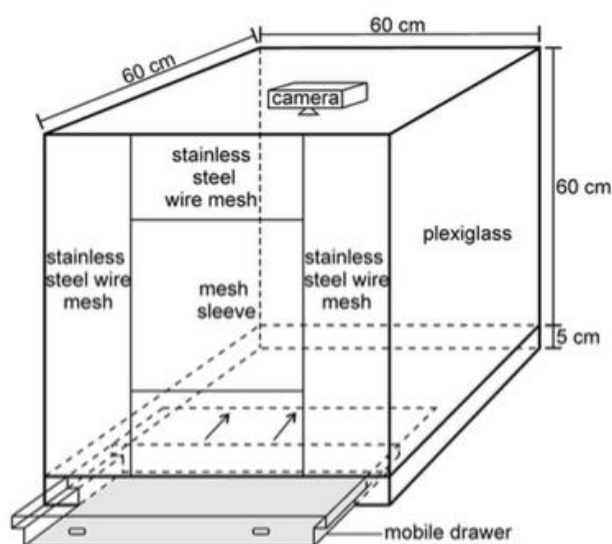


Figure 42 : Montage expérimental. Représentation schématique de la cage en bois utilisée pour les tests de choix olfactifs. La partie avant est équipée d'un manchon à mailles pour l'introduction de frelons dans la cage. La base contient un tiroir mobile de 5 cm de profondeur (en gris) et une plaque d'acier inoxydable utilisée pour livrer en toute sécurité des stimuli testés. (Source: Monceau et al. 2013a ; Couto et al. 2014).

<i>nom item</i>	<i>constitution item (surface): dans une boîte de pétri de 3.5cm diam</i>
<i>témoin</i>	papier filtre
<i>ruche</i>	1/3 de miel, 1/3 de cire d'abeille 1/3 de pollen (issu du rucher de l'INRA)
<i>poisson/viande</i>	1/2 queue de lotte (puis crevette) et 1/2 de steak haché (supermarché local)
<i>fruits/fleurs</i>	1/2 de melon et 1/2 de fleurs de bananier gorgées de nectar

Le comportement des frelons a été enregistré pendant une demi-heure au moyen d'un appareil photo numérique (Canon, digital IXUS 870 IS). Les vidéos ont été analysées à l'aide du logiciel J Watcher® afin de mesurer le **nombre de visites** et le **temps de présence** de chaque frelon sur les stimuli.

Résultats

Ce travail étant tributaire d'un matériel biologique difficile à se procurer et à manipuler, nous n'avons pas pu avoir un nombre suffisant d'individus dans toutes les catégories que nous avons voulu tester, et les résultats restent incomplets à ce jour.

Tableau 3: Bilan du nombre de répétitions ainsi que du nombre d'individus testés pour chaque modalité.

<i>Lieu de capture des frelons (Tests avec item Poisson ou Crevettes)</i>	<i>Répétitions</i>	<i>Nombre d'individus testés</i>	<i>Morts en cours de manipulation (donc non testés)</i>
<i>Fleurs de bananier (Poisson + Crevettes)</i>	4+3	18+9	2+6
<i>Appâts poisson (Poisson + Crevettes)</i>	1+1	5+4	0+1
<i>Ruche (Poisson + Crevettes)</i>	4+6	20+30	0

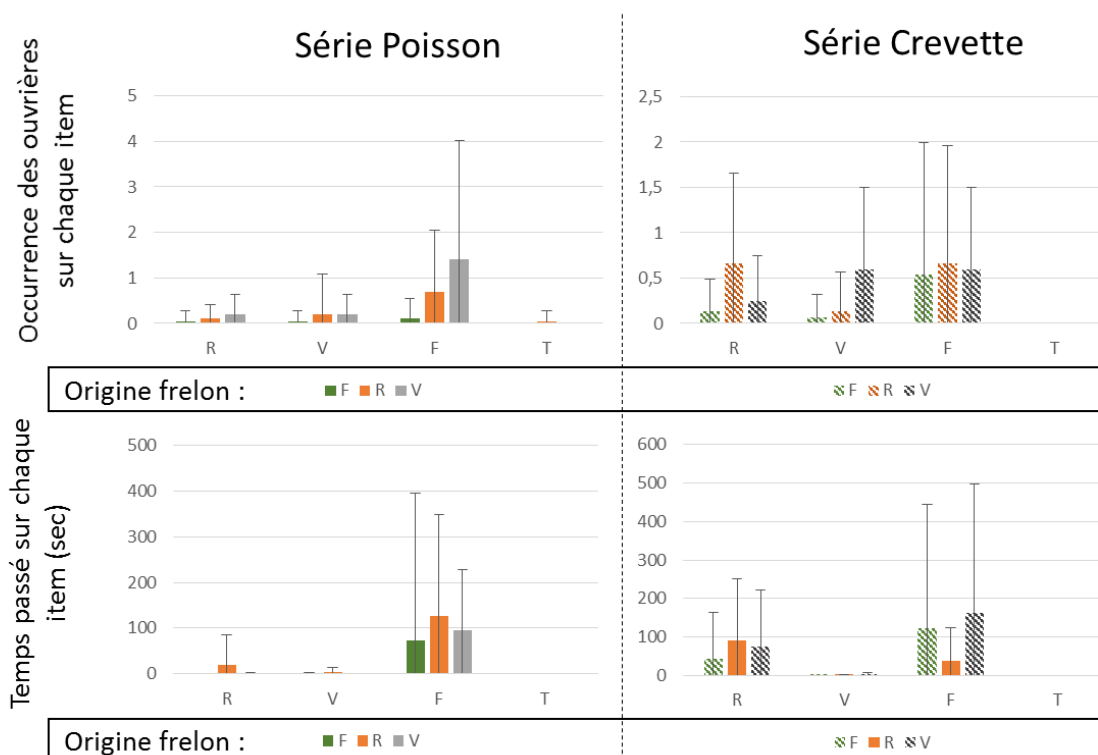


Figure 43: En haut : Histogrammes des moyennes des occurrences d’ouvrières provenant de diverses origines (vert : Fleurs ; orange : ruche ; gris : poisson (graphes de gauche)/crevette (graphes de droite)) sur chaque item (R =Produits de la ruche, V=Viande/Poisson (barres pleines, graphes de gauche) ou Viande/Crevettes (barres hachurées, graphes de droite), F=Fruits/Fleurs, T=Témoin). En bas : Histogrammes des moyennes de temps (en secondes) passé par les ouvrières provenant de diverses origines sur chaque item (idem pour la signification des lettres).

Les ouvrières capturées sur fleurs de bananier étaient plus attirées par l’item présentant du melon et des fleurs de bananier, elles y restent et le visitent en moyenne plus souvent. De même les ouvrières capturées devant des ruchers semblent plus attirées par l’item présentant du melon et des fleurs de bananier lorsque l’item viande est associé au poisson tandis qu’elles présentent le même nombre de visites sur les items « Fruits/Nectar » que « Produits de la ruche » lorsque l’item viande est associé à de la crevette. Par contre, dans le premier cas, elles ont stationné plus longtemps sur l’item « Fruits/Nectar » tandis que dans le second cas c’est sur l’item « produits de la ruche » qu’elles ont stationné le plus longtemps.

Enfin, les ouvrières capturées dans un piège à base de poisson semblent plus attirées par l'item présentant du melon et des fleurs de bananier. Elles reviennent plus sur cet item et plus longtemps. Par contre, dans le cas où les ouvrières sont capturées à l'aide de pièges à crevettes, celles-ci paraissent autant attirées par l'item « Fruits/Nectar » que par celui « Produits de la ruche ». Les ordres de grandeur du temps passé sur ces items restent semblables.

Cependant, le peu de répétitions dans certaines catégories nous empêche ici d'aller plus loin dans les analyses.

Discussion

Nous avons dans cette étude cherché à mesurer le potentiel degré de spécialisation d'ouvrières de *V. velutina* issues de diverses sources de nourriture envers ces mêmes sources, en les mettant en présence en captivité avec des items les leur rappelant. De prime abord, nous observons un pattern plutôt enclin à pencher vers du généralisme, les individus étant majoritairement attirés par l'item fruit/fleur, quelles que soient leurs origines. Mais le peu de répétitions pour les frelons capturés sur poisson rendent l'interprétation difficile. L'attrait pour les fruits/fleurs pourrait sembler logique, le sucre étant par nature le « carburant » primaire des frelons (Spradberry 1973, Matsura & Yamane 1990, Richter 2000). Il est impossible ici de différencier le comportement de collecte de celui de ravitaillement pour les ouvrières testées, qui après un certain temps en captivité cherchent peut-être préférentiellement à faire des réserves.

Cette expérimentation a été réalisée avec des ouvrières de *V. velutina* sauvages, et les choix effectués en captivité et en environnement contrôlé, dispositif inspiré du travail de Couto *et al.* 2016. Ce protocole impose donc certaines limites d'interprétation. Mais ce type d'expérimentation a été réalisé avant la mise au point de la méthode RFID, qui permettra sûrement de palier à ces freins (voir la Discussion générale de ces travaux de thèse).

Il était prévu que les frelons soient placés après capture dans la cage d'expérimentation pendant une heure (phase d'acclimatation). Cependant cette étape du protocole n'a pas pu être respectée pour tous

les individus. En effet, la capture d'ouvrières sur les fleurs de bananier nécessitait un trajet d'une demi-heure en voiture et le temps passé à y chasser s'est avéré fortement dépendante de la météo ; celles piégées par des appâts protéiques étaient gardés dans une boîte grillagée placée dans une salle climatisée à 23°C au cours de la journée jusqu'à ce que le nombre nécessaire d'individus pour l'expérience soit atteint. Cette différence de traitement a pu engendrer des fluctuations dans les réponses comportementales des frelons.

Les ouvrières d'hyménoptères peuvent collecter des ressources de manière différente suivant leur âge en fonction de leur vécu sensoriel ([Menzel & Muller 1996](#), [Dukas 1998](#)), certaines ouvrières se spécialisant peut-être par exemple dans la chasse et d'autres, plus opportunistes, dans la collecte de carbohydrates ([Voir Axe 2](#)). Dans ce cas, afin de détecter un tel fonctionnement de la colonie, les analyses statistiques devront chercher à isoler ces deux comportements et à estimer leur fréquence relative sur la population capturée, en s'assurant d'avoir également accès à l'âge des individus. Le comportement de chaque ouvrière devra alors être considéré individuellement. Pour finir, ces différences de choix alimentaires pourraient être dues à l'âge de la colonie de frelons dont les individus capturés étaient issus et de ses besoins ([Richter 2000](#), [Jeanne & Taylor 2009](#)), de la météo ([Spiewok & Schmoltz 2005](#), [Volynchik *et al.* 2008](#)) ou encore à la combinaison de ces facteurs.

ANNEXE Axe 3



V. velutina parasité par *M. robertsii*. (Photo de R. Lopez Plantey).

ANNEXE 3.1 : *Evaluation de l'efficacité de molécules insecticides et de champignons entomopathogènes sur les larves de Vespa velutina.*

Juliette Poidatz, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.

Introduction

La technique du Cheval de Troie consiste à faire rentrer dans une colonie d'organismes sociaux des agents perturbateurs cachés dans des appâts par le biais des collectrices de la colonie, afin de détruire la colonie de l'intérieur. L'utilisation de cette stratégie est de plus en plus utilisée en contrôle « classique » et biologique chez les insectes sociaux, impliquant dans le premier cas l'utilisation d'un agent de type insecticide (par exemple [Buczkowski 2016](#) sur *Pachycondyla chinensis*), ou dans le deuxième cas un agent biologique (bactérie, champignon, virus, nématode...) (par exemple [Rocha et al. 2017](#) sur *Atta sexdens rubropilosa*).

Les frelons sont des insectes sociaux vivant en colonies, pouvant atteindre chez l'espèce qui nous intéresse ici, *V. velutina*, une population de plusieurs milliers d'individus en fin d'Automne ([Monceau et al. 2014a](#)). *V. velutina* est un frelon venant de Chine accidentellement introduit en France en 2004 qui se répand à travers l'Europe, menaçant par sa consommation d'arthropodes et surtout d'abeilles l'apiculture et la biodiversité ([Monceau et al. 2014a](#)). Le contrôle de cette espèce est à l'heure actuelle peu efficace et coûteux, passant par des pièges, des filets ou la destruction des rares colonies détectées ([Monceau et al. 2012, 2014a](#)). La nécessité de développer des techniques de contrôle où les opérateurs pourront détruire les colonies sans avoir à y accéder s'accroît, maintenant que cette espèce pullule et s'installe dans des endroits inaccessibles.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer l'efficacité de différents insecticides et champignons entomopathogènes sur les larves du frelon invasif *V. velutina*. Un total de 300 larves de ce frelon ont ainsi été testées avec trois insecticides à deux concentrations différentes, ainsi qu'avec un isolat de *Beauveria bassiana* et un isolat de *Metarhizium robertsii*.

Matériel et méthodes

Une colonie de frelons de très grande taille récoltée dans la région de Bordeaux, constituée de 4 galettes de couvain d'environ cent cellules chacune, a été divisée en 11 sous-groupes de 30 larves par modalité (plus un témoin de 10 larves supplémentaires dans la galette 2) (Figure 44). Trois insecticides D, S et F ont été testés ici à deux doses différentes : la dose homologuée (DH) et 10 fois cette dose (DHx10). Le nom des produits est gardé secrets pour des raisons de confidentialité.

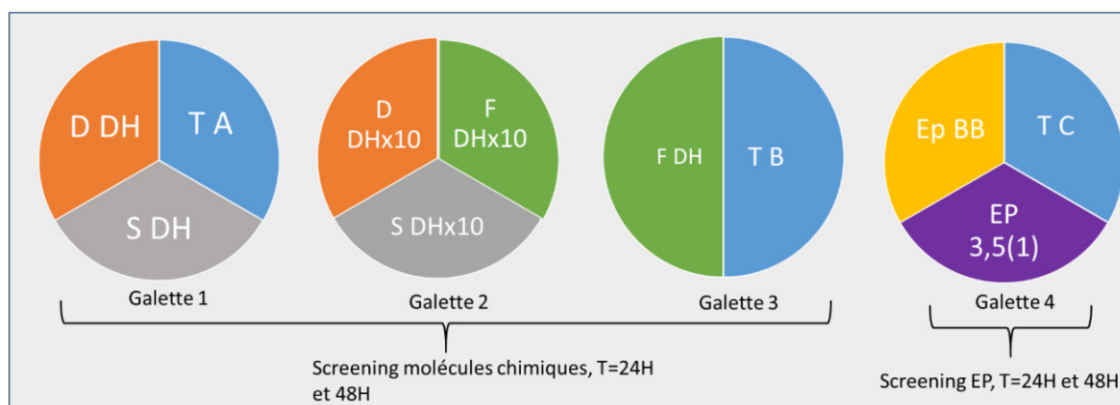


Figure 44 : Répartition des diverses modalités suivant les galettes de nid, chaque couleur correspondant à un traitement. Produits : D, S et F. Entomopathogènes : EP BB et EP 3.5(1). Témoins (eau distillée) : TA, TB et TC. DH = Dose Homologuée. Chaque zone comprend 30 larves d'un stade proche, excepté pour le extra témoin de 10 larves ajouté sur la galette 2 (Schéma J. Poidatz).

Là où les larves traitées reçoivent 5µL de solution de produit (Figure 45A) ou de solution de spores à 10^7 spore/ml (Figure 45B), celles témoins reçoivent 5µL d'eau distillée. Toutes les larves sont nourries d'asticots (asticots de pêche du commerce) broyés au mixeur, 3 fois par jour, pendant toute la durée de l'expérimentation, i.e. 2 jours avant les traitements et 2 jours après l'application des produits (Figure 45C).

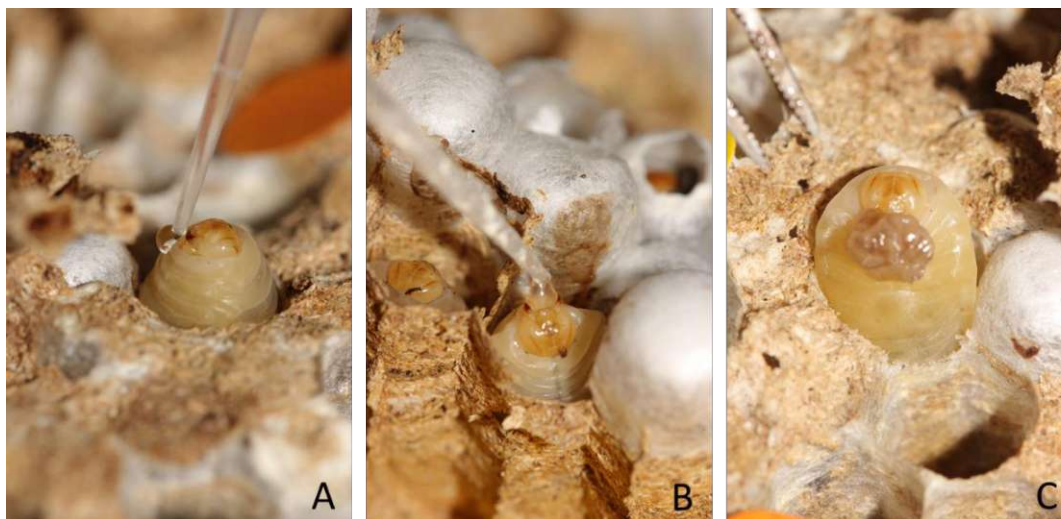


Figure 45 : Larves de *Vespa velutina* auxquelles 5 μ L d'insecticide (A) ou de solution de spores de champignons entomopathogènes (B) sont distribuées à la pipette. C : larve venant de recevoir un bout d'asticot.

Après traitement, la bonne santé des larves a été estimée en mesurant leur taux de réponse à un stimulus physique, ici une légère pression sur la scapula avec la pointe d'une pince : OK = larve active, mandibules mobiles ; Dépérissant : la larve bouge mais n'ouvre pas les mandibules suite au stimulus ; Morte : larve morte (Figure 46).

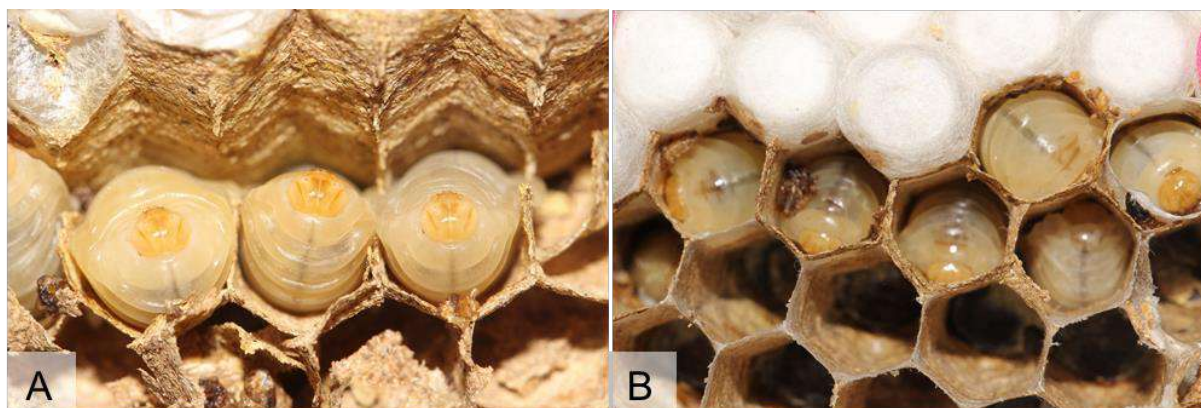


Figure 46 : A : larves en bonne santé, la tête levée pour quémander de la nourriture : B : larves moribondes, prostrées et recroquevillées.

Résultats

Molécules insecticides

Les larves témoins ont bien réagi à l'essai, avec un taux de survie de plus de 95%. Concernant le produit D, une efficacité modérée a été observée, que cela soit à dose pleine ou x10.

Pour le produit F, on observe une létalité importante (>50%) des larves lorsqu'elles le reçoivent à la dose homologuée, alors que très peu d'effet est observé à la dose x10. Une efficacité totale à la dose X10 a été observée pour les individus traités avec le produit S, qui se révèle par contre sans effet à la dose homologuée. (Figure 47).

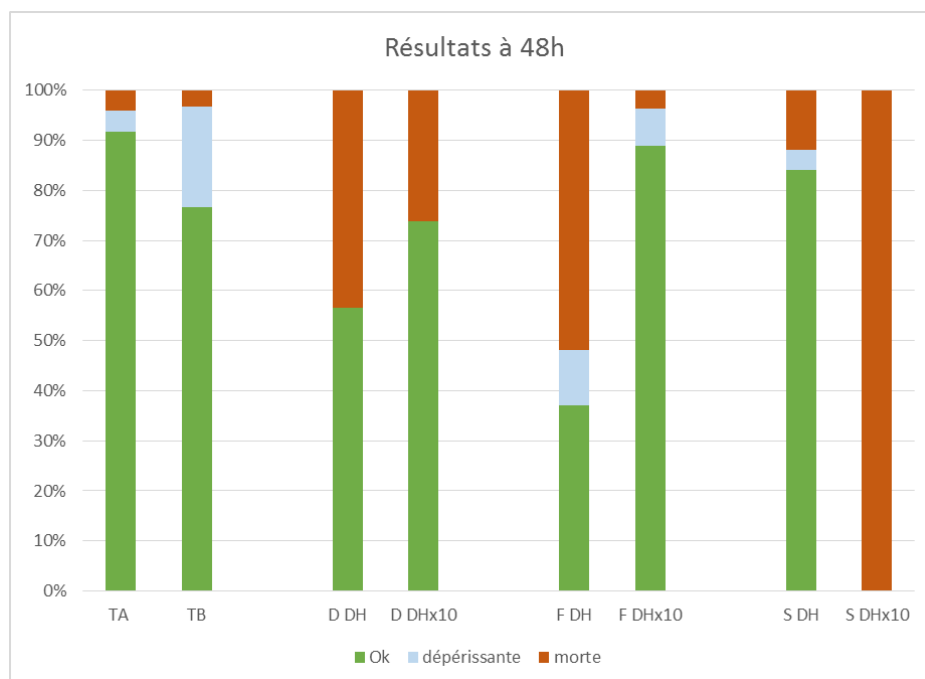


Figure 47 : Effet des traitements par des insecticides D, F et S à dose homologuée (DH) ou DHx10.

Entomopathogènes

L'effet des champignons étant plus lent que celui de produits sur la survie des frelons, nous avons eu un problème lié aux émergences de jeunes adultes de la galette après le lancement de l'expérimentation. Alors que ces individus étaient normalement retirés de la boîte 12h max après émergence dans les autres modalités, nous n'avons pas été en mesure d'effectuer cette opération pendant 48h, 72h après le lancement de l'expérimentation. Ces adultes se sont donc nourris des régurgitas larvaires des larves testées et en ont tué une grande partie. Nous avons donc juste un suivi à 24h, bien trop tôt pour observer l'effet d'une infection, et au-delà de ce temps, les données ne nous ont pas semblées assez rigoureuses pour être présentées ici, toutes les larves ayant été touchées (T et traitées).

Discussion

Dans ces travaux nous avons mesuré pour la première fois l'efficacité potentielle de certains insecticides et entomopathogènes sur des larves du frelon asiatique *V. velutina*.

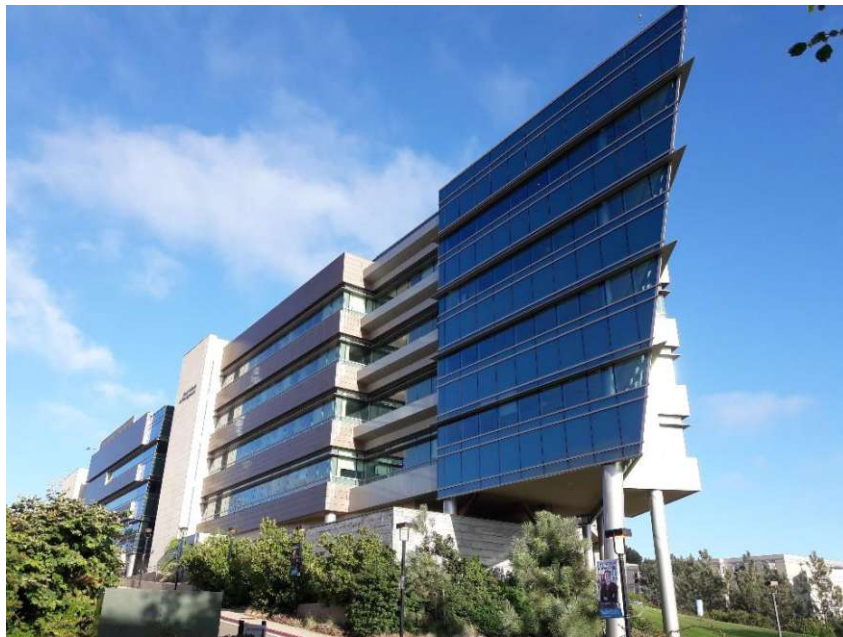
L'intérêt de molécules insecticides dans le traitement de nids de *V. velutina* par cheval de Troie reste sujet à précaution, car les nids ainsi traités sont des potentielles sources de contamination pour l'environnement. En effet, les nids une fois mort ou affaiblis pourront être attaqués par des prédateurs (oiseaux, mammifères) et autres charognards qui s'intoxiqueront par l'ingestion cumulée des insectes traités. De plus la dégradation naturelle du nid entraînera le lessivage des molécules et leur accumulation dans le sol et l'eau. Les molécules utilisées devraient donc avoir une très faible toxicité pour les oiseaux et mammifères et des résidus non toxiques après dégradation.

Dans les travaux de [Rose et al. 1999](#), des essais ont été réalisés pour évaluer l'efficacité de différents entomopathogènes sur des couvains de guêpes *V. vulgaris*. Pour éviter le problème que nous avons rencontré dans notre expérimentation, où des adultes ont émergé et tué les larves traitées avec les entomopathogènes, ces auteurs ont percé les cellules contenant des nymphes à l'aide d'une épingle avant de lancer l'essai. Il serait utile de renouveler l'expérience en adaptant ce point du protocole, pour tirer des conclusions de cet essai sur les entomopathogènes : en effet, même si l'infection a bien eu lieu, la mort trop précoce de l'insecte hôte bloque son développement ([Hajek & St Leger 1994](#)), et il est impossible d'évaluer la létalité potentielle du pathogène.

Une évaluation environnementale rigoureuse devra être réalisée dans les deux cas (insecticides ou agent de lutte biologique), afin de limiter au maximum les risques potentiels liés à leur usage (dosage, stabilité, spectre d'action etc.).

ANNEXE 4

PUBLICATIONS & FORMATIONS



Bibliothèque de l'université de San Diego (California)

ANNEXE 4 : Publications et formations

Liste des talks et posters réalisés pendant cette thèse

Type	date	Titre	Auteurs	Congrès
Poster	26-28 aout 2015	Maturité sexuelle des mâles de frelon asiatique à patte jaune <i>Vespa velutina</i> , un prédateur invasif d'abeilles.	Juliette Poidatz, Christophe Bressac, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.	28 ^{ème} congrès de l'UIEI-Section Française, IRBI Tours, France.
Talk	1-3 juillet 2015	Biology and behavior of <i>Vespa velutina</i> , an invasive predator of bees	Juliette Poidatz	7 ^{ème} journées des doctorants SPE, Agro-campus Ouest Rennes, France
Poster	19 février 2016	Rescent collaborative research on <i>Vespa velutina</i> in France.	Juliette Poidatz, Karine Monceau, Christophe Bressac, Jean-Christophe Sandoz, Antoine Couto, Gérard Arnold, Alexandros Papachristoforou, Marie-Angela Arca, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.	COLOSS <i>Velutina</i> task force kickoff meeting, DOI: 10.13140/RG.2.1.4691.9440, Turin, Italy.
Talk + Poster	2-4 février 2016	« Petit » frelon deviendra grand. Etude de la fertilité du frelon asiatique <i>Vespa velutina</i> , un prédateur invasif d'abeille.	Juliette Poidatz, Christophe Bressac, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.	Journées de la recherche apicole, Paris, France
Talk	3 mars 2016	Avancées sur la biologie du frelon asiatique à pattes jaunes <i>Vespa velutina</i> .	Juliette Poidatz.	AG de l'Association pour le Développement Apicole d'Aquitaine, Marmande, France.
Talk	11-13 juillet 2016,	Best practice exchanges – Thesis on the invasive predator of bees, <i>V. velutina</i> -	Juliette Poidatz, Denis Thiéry, Bénédicte Laborie.	Global Beecare Conference – Cologne, Germany.
Talk	9 août 2016,	Reproductive traits of females and males in two invasive hornets.	Juliette Poidatz, Christophe Bressac, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.	European IUSSI, Helsinki, Finland.
Talk	22-23 juin 2017	Studying the homing ability and workers activity in <i>Vespa velutina</i> using RFID technique.	Juliette Poidatz, Karine Monceau, Olivier Bonnard, Denis Thiéry.	COLOSS <i>Velutina</i> task force kickoff meeting., Mallorca, Spain
Talk	13-17 août 2017	Can generalist pathogens control the invasive predator of bees <i>Vespa velutina</i> in Europe ?	Juliette Poidatz, Rodrigo J. López Plantey, Denis Thiéry.	Fungi section, Society of Invertebrate Patology annual meeting, San Diego, California.

Article supplémentaire

Un article en co-auteur sur des travaux antérieurs à la thèse a été publié durant ma thèse.

Monceau, K., Moreau, J., **Poidatz, J.**, Bonnard, O., Thiéry, D. (2015) Behavioral syndrome in a native and an invasive hymenoptera species: Behavioral syndrome in hymenoptera species. *Insect Science* **22**, 541–548. doi:10.1111/1744-7917.12140

Liste des formations réalisées durant cette thèse

- Atelier R sur données personnelles, 2-3 avril 2015, Anstat.
- Rédaction scientifique en anglais, 25-28 janvier 2016, INRA, Daphne Goodfellow.
- Ecole d'été Labex COTE « Ecology and Society : Biodiversity and global change », 22-26 juin 2015, Cadillac, France.
- Initiation à l'utilisation du logiciel R, 11-12 février 2016, INRA
- Traitement et analyse d'image sous Image J, 7-9 septembre 2015, INSERM
- Automatisation des tâches sous Image J / les macros, 21-23 septembre 2015, INSERM
- Propriété Intellectuelle. ED Université Bordeaux Montaigne

Bourses obtenues durant cette thèse

- Bourse de mobilité Labex COTE pour une mission en Italie de deux mois
- Bourse de Master 2 Labex COTE pour engager une étudiante sur le projet

Références bibliographiques

- Abrol, D.P. (1994) Ecology, behaviour and management of social wasp, *Vespa velutina* Smith (Hymenoptera: Vespidae), attacking honeybee colonies. *Korean Journal of Apiculture* **9**, 5–10.
- Abrol, D.P. & Kapil, R.P. (1994) On homing ability and pollination effectiveness of bees. *Mysore Journal of Agricultural Sciences* **28**, 249–252.
- Agüero, F.M.A. & Neves, O.J. (2014) Selectivity of *Metarhizium anisopliae* to *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). *Investigación Agraria* **16**, 21–28.
- Akre, R.D., Garnett, W.B., MacDonald, J.F., Greene, A. & Landolt, P. (1976) Behavior and colony development of *Vespula pensilvanica* and *V. atropilosva* (Hymenoptera: Vespidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* **49**, 63–84
- Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A. & Kamel, F. (2004) Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annual Review of Public Health* **25**, 155–197. doi:10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020
- Alcock, J., Barrows, E.M., Gordh, G., Hubbard, L.J., Kirkendall, L., Pyle, D.W., Ponder, T.L. & Zalom, F.G. (1978). The ecology and evolution of male reproductive behaviour in the bees and wasps. *Zool. J. Linn. Soc.* **64**, 293–326. doi:10.1111/j.1096-3642.1978.tb01075.x
- Alean, I.R.I.N.A., 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yucca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Grade work presented as final project for the Agricultural Microbiology and Veterinaty Grade, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas Microbiología Agrícola y Veterinaria, Colombia.
- Alford, R.A., Brown, G.P., Schwarzkopf, L., Phillips, B.L. & Shine, R. (2009) Comparisons through time and space suggest rapid evolution of dispersal behaviour in an invasive species. *Wildlife Research* **36**, 23. doi:10.1071/WR08021
- Allen, G.R., Kazmer, D.J. & Luck, R.F. (1994) Post-copulatory male behaviour, sperm precedence and multiple mating in a solitary parasitoid wasp. *Animal Behaviour* **48**, 635–644.
- Allendorf, F.W. & Lundquist, L.L. (2003) Introduction: Population Biology, Evolution, and Control of Invasive Species. *Conservation Biology* **17**, 24–30. doi:10.1046/j.1523-1739.2003.02365.x
- Angulo Lucena, R., Farouk Allam, M., Serrano Jimenez, S. & Luisa Jodral Villarejo, M. (2007) A review of environmental exposure to persistent organochlorine residuals during the last fifty years. *Current Drug Safety* **2**, 163–172. doi:10.2174/157488607780598313
- Araújo, V.A., Zama, U., Dolder, H. & Lino-Neto, J.J. (2005) Morphology and Ultrastructure of the Spermatozoa of *Scaptotrigona Xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal Morphological Science* **22**, 137–41.

Références

- Araújo, V.A., Moreira, J. & Lino-Neto, J.J. (2010) Morphology of the male reproductive system of the social wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic implications. *Journal of Insect Science* **10** (71), 1-10.
- Arca, M.A. (2012a) Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae), PhD thesis University Pierre et Marie Curie : 106-111.
- Arca, M.A., Capdevielle-Dulac, C., Villemant, C., Mougel, F., Arnold, G. & Silvain, J.-F. (2012b) Development of microsatellite markers for the yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina*, a major threat for European bees. *Conservation Genetics Resources* **4**, 283–286.
- Arca, M., Mougel, F., Guillemaud, T., Dupas, S., Rome, Q., Perrard, A., Muller, F., Fossoud, A., Capdevielle-Dulac, C., Torres-Leguizamon, M., Chen, X.X., Tan, J.L., Jung, C., Villemant, C., Arnold, G. & Silvain, J.F. (2015) Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, in Europe. *Biological Invasions* **17**:2357–2371. doi:10.1007/s10530-015-0880-9
- Arca, M., Papachristoforou, A., Mougel, F., Rortais, A., Monceau, K., Bonnard, O., Tardy, P., Thiéry, D., Silvain, J.-F. & Arnold, G. (2014) Defensive behaviour of *Apis mellifera* against *Vespa velutina* in France: Testing whether European honeybees can develop an effective collective defence against a new predator. *Behavioural Processes* **106**, 122–129. doi:10.1016/j.beproc.2014.05.002
- Archer, M.E. (1994) Taxonomy, distribution and nesting biology of the *Vespa bicolor* group (Hymenoptera: Vespinae). *Entomol. Mon. Mag.* **130**, 149–158
- Archer, M.E. (2004) All-day foraging characteristics of successful underground colonies of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera, Vespidae) in England. *Insect. Soc.* **51**, 171–178. doi:10.1007/s00040-004-0731-7
- Asensio, L., Carbonell, T., López-Jimenez, J.A. & López-Llorca, L.V. (2003) Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Spanish Journal of Agricultural Research* **1**, 37-45.
- Bacon, O.G., Burton, V.E., Mc Swain, J.W., Marble, V.L., Stanger, W. & Thorp, R.W. (1965) Pollinating alfalfa with leaf-cutting bees (AXT 160). University of California Agricultural Extension Service, Berkeley, CA.
- Baer, B. (2003) Bumblebees as model organisms to study male sexual selection in social insects. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **54**, 521–533. doi:10.1007/s00265-003-0673-5
- Baer, B. (2014) Sexual selection in social insects. The evolution of Insects Mating Systems. Ed David M. Shuker and Leigh W. Simmons. *The royal entomological society. Publishing by Oxford University press*, 261-275.
- Baer, B., & Boomsma, J. (2004) Male reproductive investment and queen mating-frequency in fungus-growing ants. *Behavioral Ecology* **15**, 426-432.

Références

- Baer, B. & Schmid-Hempel, P. (1999) Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature* **397**, 151-154.
- Baer, B. & Schmid-Hempel, P. (2001) Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Evolution* **55**, 1639-1643.
- Baguley, T. (2012) *Serious Stats: A guide to advanced statistics for the behavioral sciences*. Palgrave Macmillan, Palgrave.
- Barbet-Massin, M., Rome, Q., Muller, F., Perrard, A., Villemant, C. & Jiguet, F. (2013) Climate change increases the risk of invasion by the Yellow-legged hornet. *Biological Conservation* **157**, 4–10. doi:10.1016/j.biocon.2012.09.015
- Basili, A.M. & Merwin, A.C. (2016) Kudzu bug wing loading along an invasion gradient.
- Batra, S.W.T. (1980) Sexual behavior and pheromones of the European hornet, *Vespa crabro germana* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 461–469.
- Baverstock, J., Roy, H.E. & Pell, J.K. (2010) Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl* **55**, 89–102. doi:10.1007/s10526-009-9238-5.
- Beani, L., Dallai, R., Mercati, D., Cappa, F., Giusti, F. & Manfredini, F. (2011) When a parasite breaks all the rules of a colony: morphology and fate of wasps infected by a strepsipteran endoparasite. *Animal Behaviour* **82**, 1305-1312.
- Beani, L., Dessì-Fulgheri, F., Cappa, F. & Toth, A. (2014) The trap of sex in social insects: From the female to the male perspective. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **46**, 519–533. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.09.014
- Beani, L. & Zaccaroni, M. (2015) Experimental male size manipulation in *Polistes dominulus* paper wasps: being the right size. *Ethology, Ecology & Evolution* **27**, 185-199.
- Beckers, R., Goss, S., Deneubourg, J.-L. & Pasteels, J.-M. (1989) Colony size, communication, and ant foraging strategy. *Psyche* **96**, 239–256.
- Beggs, J.R. (2001) The ecological consequences of social wasps (*Vespula* spp.) invading an ecosystem that has an abundant carbohydrate resource. *Biological Conservation* **99**, 17-28.
- Beggs, J.R., Brockerhoff, E.G., Corley, J.C., Kenis, M., Masciocchi, M., Muller, F., Rome, Q. & Villemant, C. (2011) Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. *BioControl* **56**, 505–526. doi:10.1007/s10526-011-9389-z
- Beggs, J.R. & Rees, J.S. (1999) Restructuring of Lepidoptera communities by introduced *Vespula* wasps in a New Zealand beech forest. *Oecologia* **119**, 565-571.
- Beggs, J.R. & Wilson, P.R. (1991) The kaka *Nestor meridionalis*, a New Zealand parrot endangered by introduced wasps and mammals. *Biological Conservation* **56**, 23-38.
- Bell, W.J. (1990) Central place foraging. In W.J. Bell (Ed.), *Searching behaviour: The behavioural ecology of finding resources*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 171–187.

Références

- Berg, T., Røyset, O., Steinnes, E. & Vadset, M. (1995) Atmospheric trace element deposition: principal component analysis of ICP-MS data from moss samples. *Environmental Pollution* **88**, 67-77.
- Berggren, H., Tinnert, J. & Forsman, A. (2012) Spatial sorting may explain evolutionary dynamics of wing polymorphism in pygmy grasshoppers. *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 2126–2138. doi:10.1111/j.1420-9101.2012.02592.x
- Bermond, G., Cavigliasso, F., Mallez, S., Spencer, J. & Guillemaud, T. (2014) No Clear Effect of Admixture between Two European Invading Outbreaks of *Diabrotica virgifera virgifera* in Natura. *PLOS ONE* **9**, e106139. doi:10.1371/journal.pone.0106139.
- Berry, W. L., Stimmann, M.W. & Wolf, W.W. (1972). Marking of native phytophagous insects with rubidium: A proposed technique. *Annals of the Entomological Society of America* **65**, 236–38.
- Bessa, A.S., Carvalho, J., Gomes, A. & Santarém, F. (2016) Climate and land-use drivers of invasion: predicting the expansion of *Vespa velutina nigrithorax* into the Iberian Peninsula. *Insect Conservation and Diversity* **9**, 27–37. doi:10.1111/icad.12140
- Bidochka, M.J., Kasperski, J.E. & Wild, G.A. (1998) Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journal of Botany* **76**, 1198–1204.
- Bidochka, M.J. & Small, C. (2005) Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In *Insect-Fungal associations: Ecology and evolution*. Ed Fernando E. Vega, Meredith Blackwell, Oxford University press, London.
- Billen, J. & Morgan, D.E. (1998) Chapitre 1: Pheromone communication in social insects: Sources and secretions. In “Pheromone Communication in Social Insects, Ants, Wasps, Bees and Termites”. Ed R.K. Vander Meer, M.D. Breed, K.E. Espelie and M.L. Winston. WestviewPress. Pp3-33.
- Blackburn, T.M., Gaston, K.J. & Loder, N. (1999) Geographic gradients in body size: a clarification of Bergmann’s rule. *Diversity and distributions* **5**, 165–174.
- Blackburn, T.M., Cassey, P. & Lockwood, J.L. (2009) The role of species traits in the establishment success of exotic birds. *Global Change Biology* **15**, 2852–2860. doi:10.1111/j.1365-2486.2008.01841.x
- Blay, S. & Yuval, B. (2014) Oviposition and Fertility in the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae): Effects of Male and Female Body Size and the Availability of Sperm. *Annales of the Entomological Society of America* **92**, 278-284. doi: 10.1093/aesa/92.2.278.
- Bonavita-Cougourdan, A. & Passera, L. (1978) Etude comparative au moyen d’or radio-actif de l’alimentation des larves d’ouvrières et des larves de reine chez la fourmi *Plagiolepis pygmaea latr.* *Insectes Sociaux* **25**, 275-287.

Références

- Boiteau, G., Meloche, F., Vincent C & Leskey, T.C. (2009) Effectiveness of glues used for harmonic radar tag attachment and impact on survival and behavior of three insect pests. *Environmental Entomology* **38**, 168–175.
- Boomsma, J.J. & Ratnieks, F.L. (1996) Paternity in Eusocial Hymenoptera. *Philosophical transactions of the royal society B* **351**, 947-975; DOI: 10.1098/rstb.1996.0087.
- Boomsma, J.J., Baer, B. & Heinze, J. (2005) The evolution of male traits in social insects. *Annual Review of Entomology* **50**, 395-420.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C., (1991) Chapter 5 : Attachment of Mycopathogens to cuticle. In “The fungal spore and disease initiation in plants and animals”. G.T. Cole et al. (eds.). Springer Science + Business Media New York. Pp101-127.
- Bowen, R.H. (1920) Studies on insect spermatogenesis I. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. *The Biological Bulletin* **39**, 316–362.
- Bradshaw, C.J.A., Leroy, B., Bellard, C., Roiz, D., Albert, C., Fournier, A., Barbet-Massin, M., Salles, J.-M., Simard, F. & Courchamp, F. (2016) Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications* **7**, 12986. doi:10.1038/ncomms12986
- Bressac, C. & Chevrier, C. (1998) Offspring and sex ratio are independent of sperm management in *Eupelmus orientalis* females. *Journal of Insect Physiology* **44**, 351–359.
- Bressac, C., Damiens, D. & Chevrier, C. (2008). Sperm stock and mating of males in a parasitoid wasp. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **310**, 160-166.
- Briese, D.T. (2000) Classical Biological Control. In Sindel, B. (ed.), Australian Weed Management Systems. RG & FJ Richardson Press. Pp. 161-192
- Brown, M.J.F. & Paxton, R.J. (2009) The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie* **40**, 410–416.
- Brown, G.P., Phillips, B.L. & Shine, R. (2014) The straight and narrow path: the evolution of straight-line dispersal at a cane toad invasion front. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**, 20141385–20141385. doi:10.1098/rspb.2014.1385
- Buczkowski, G. (2016) The Trojan horse approach for managing invasive ants: a study with Asian needle ants, *Pachycondyla chinensis*. *Biological Invasions* **18**, 507–515. doi:10.1007/s10530-015-1023-z
- Burges, H.D. (1998) Formulation of myoinsecticides. In H. S. Burges (Ed.), Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Dordrecht: Kluwer Academic, 131-185.
- Bushrow, E. S., Fuller, C. L., Cowan, D. P. & Byrd, C. A. (2006) Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). *Invertebrate Biology* **125**, 354–362.

Références

- Butt, T. M. (1990) Proceedings and abstracts, Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia. pp. 121-124.
- Butt, T.M., Ibrahim, L., Ball, B.V. & Clark, S.J. (1994) Pathogenicity of the entomogenous, hyphomycete fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontrol Science and Technology* **4**, pp. 207-214.
- Butt, T.M., Ibrahim, L., Clark, S.J. & Beckett, A. (1995) The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycological Research* **99**, 945–950.
- Butt, T.M., Jackson, C. & Magan, N. (Eds.) (2001) Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential. CABI Pub, Oxon, UK ; New York.
- Cameron, S.A., Lozier, J.D., Strange, J.P., Koch, J.B., Cordes, N., Solter, L.F. & Griswold, T.L. (2011) Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 662–667.
- Campbell, L.M., Fisk, A.T., Wang, X., Köck, G. & Muir, D.C. (2005) Evidence for biomagnification of rubidium in freshwater and marine food webs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **62**, 1161–1167. doi:10.1139/f05-027
- Cane, J.H., Gerdin, S. & Wife, G. (1983) Mandibular gland secretions of solitary bees (Hymenoptera: Apoidea): potential for nest cell disinfection. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 199–204.
- Cañedo, V. & Ames, T. (2004) Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos .V. Cañedo and T. Ames, Eds. International Center of Potato, Lima, Peru: CIP. <http://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org
- Canevazzi, N.C.S. & Noll, F.B. (2011) Environmental factors influencing foraging activity in the social wasp *Polybia paulista* (hymenoptera: Vespidae: Epiponini). *Psyche* **2011**, 1-8. doi:10.1155/2011/542487
- Capaldi, E.A., Smith, A.D., Osborne, J.L., Fahrbach, S.E., Farris, S.M., Reynolds, D.R., Edwards, A.S., Martin, A., Robinson, G.E., Poppy, G.M. & Riley, J.R. (2000) Ontogeny of orientation flight in the honeybee revealed by harmonic radar. *Nature* **403**, 537–540. doi:10.1038/35000564
- Carpenter, J.M. & Kojima, J. (1997) Checklist of the species in the subfamily Vespinae (Insecta: Hymenoptera: Vespidae). *Natural history bulletin of Ibaraki University* **1**, 51–92.
- Cassill, D.L. & Tschinkel, W.R. (1995). Allocation of liquid food to larvae via trophallaxis in colonies of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Animal behaviour* **50**, 801-813.
- de Castro, M.M., Guimaraes, D.L. & Prezoto, F. (2011) Influence of environmental factors on the foraging activity of *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology* **58**:138–141.
- Cervo, R., Zacchi, F. & Turillazzi, S. (2000) *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) invading North America: some hypotheses for its rapid spread. *Insectes Sociaux* **47**, 155–157.

Références

- Cervo, R., Stemmer, C., Castle, W., Queller, D. & Strassman, J.E. (2004). Social parasitism of *Polistes dominulus* by *Polistes nimphus* (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Sociaux* **51**, 101-108.
- Chapin, F.S.III, Zavaleta, E.S., Eviner, V.T., Naylor, R.L., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., Hooper, D.U., Lavorel, S., Sala, O.E., Hobbie, S.E., Mack, M.C. & Diaz, S. (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature* **405**, 234-242.
- Chapple, D.G., Simmonds, S.M. & Wong, B.B.M. (2012) Can behavioral and personality traits influence the success of unintentional species introductions? *Trends in Ecology & Evolution* **27**, 57–64. doi:10.1016/j.tree.2011.09.010
- Chapman, R.F. (1998) *The Insects: Structure and Function*, 4th ed. University Press, Cambridge.
- Chapman, R.E. and Bourke, A.F.G. (2001) The influence of sociality on the conservation biology of social insects. *Ecology Letters* **4**, 650–662.
- Chapman, J., Reynolds, D. & Smith, A. (2004) Migratory and foraging movements in beneficial insects: A review of radar monitoring and tracking methods. *International Journal of Pest Management* **50**, 225-232.
- Chevrier, C. & Bressac, C. (2002) Sperm storage and use after multiple mating in *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Insect Behavior* **15**, 385-398.
- Chirault, M., Lucas, C., Goubault, M., Chevrier, C., Bressac, C. & Lécureuil, C. (2015) A Combined approach to heat stress effect on male fertility in *Nasonia vitripennis*: From the physiological consequences on spermatogenesis to the reproductive adjustment of females mated with stressed males. *PLoS ONE* **10**, e0120656.
- Choi, M.B., Martin, S.J. & Lee, J.W. (2012) Distribution, spread, and impact of the invasive hornet *Vespa velutina* in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **15**, 473–477. doi:10.1016/j.aspen.2011.11.004.
- Cini, A., Meconcelli, S. & Cervo, R. (2013) Ovarian indexes as indicators of reproductive investment and egg-laying activity in social insects: a comparison among methods. *Insectes Sociaux* **60**, 393–402. doi:10.1007/s00040-013-0305-7.
- Clapperton, B.K., Tilley, J.A.V. & Pierce, R.J. (1996) Distribution and abundance of the Asian paper wasp *Polistes chinensis antennalis* Perez and the Australian paper wasp *P. humilis* (Fab.) (Hymenoptera: Vespidae) in New Zealand, *New Zealand Journal of Zoology*, **23**, 19-25, DOI: 10.1080/03014223.1996.9518062.
- Cohen, A.C. & Jackson, C.G. (1989). Using rubidium to mark a predator, *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of Entomological Science* **24**, 57–61.
- Cole, B.J. (1983) Multiple mating and the evolution of social behavior in the hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **12**, 191–201. doi:10.1007/BF00290771
- Collett, T.S. & Collett M. (2002) Memory use in insect visual navigation. *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 542–552. doi:10.1038/nrn872.

Références

- Colonello, N.A. & Hartfelder, K. (2005) She's my girl - male accessory gland products and their function in the reproductive biology of social bees. *Apidologie* **36**, 231-244.
- Conceição, P. de J., Neves, C.M. de L., Sodré, G. da S., Carvalho, C.A.L. de, Souza, A.V., Ribeiro, G.S. & Pereira, R. de C. (2014) Susceptibility of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) worker bees to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Sociobiology* **61**, 184–188.
- Cook, J.M. & Crozier, R.H. (1995) Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *TREE* **10**, 281-286.
- Corsini, E., Liesivuori, J., Vergieva, T., Van Loveren, H. & Colosio, C. (2008) Effects of pesticide exposure on the human immune system. *Human & Experimental Toxicology* **27**, 671–680. doi:10.1177/0960327108094509
- Courchamp, F., Fournier, A., Bellard, C., Bertelsmeier, C., Bonnaud, E., Jeschke, J.M. & Russell, J.C., (2017) Invasion Biology: Specific Problems and Possible Solutions. *Trends in Ecology & Evolution* **32**, 13–22. doi:10.1016/j.tree.2016.11.001
- Couto, A., Monceau, K., Bonnard, O., Thiéry, D. & Sandoz, J.C. (2014) Olfactory attraction of the hornet *Vespa velutina* to honeybee colony odors and pheromones. *PLoS ONE* **9** :e115943. doi:10.1371/journal.pone.0115943.
- Couto, A., Lapeyre, B., Thiéry, D. & Sandoz, J.C. (2016) The olfactory pathway of the hornet *Vespa velutina*: new insights into the evolution of the hymenopteran antennal lobe. *Journal of Comparative Neurology* **6**, 1-25. doi:10.1002/cne.23975
- Cowan, D.P. & Stahlhut, J.K. (2004) Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10374–10379.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O. & Schmid-Hempel, P. (2007) Social Immunity. *Current Biology* **17**, R693–R702. doi:10.1016/j.cub.2007.06.0081007/s10526-011-9389-z
- Crozier, R.H. & Page, R.E. (1985) On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behavioral ecology and sociobiology* **18**, 105–115.
- Crozier R.H. & Fjerdingstad E.J. (2001). Polyandry in social Hymenoptera: disunity in diversity? *Annual Zoology Fennici* **38**, 267–85.
- Cruz-Landim, C. (2001) Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia, Série Zoologia* **91**, 183-189.
- Cruz-Landim, C., Beig, D. & De Moraes, R.L.M.S. (1980) The process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Caryologia* **33**, 1-15.
- Cruz, J.D., Giannotti, E., Santos, G.M.M., Bichara Filho, C.C. & Resende, J.J. (2006) Daily activity resources collection by the swarm-founding wasp *Angiopolybia pallens* (Hymenoptera : Vespidae). *Sociobiology* **47**, 829–842.

Références

- Dallai, R. (2014) Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod structure and development* **43**, 257-90.
- Damiens, D., Bressac, C., Brillard, J.-P. & Chevrier, C. (2002) Qualitative aspects of sperm stock in males and females from *Eupelmus orientalis* and *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Chalcidoidea) as revealed by dual fluorescence. *Physiological Entomology* **27**, 97-102.
- Damiens, D., Bressac, C. & Chevrier, C. (2003) The effect of age on sperm stock and egg laying in the parasitoid wasp, *Dinarmus basalis*. *Journal of Insect Science* **3**, 5.
- Damiens, D. & Boivin, G. (2005) Male reproductive strategy in *Trichogramma evanescens*: sperm production and allocation to females. *Physiological Entomology* **30**, 241–247.
- Dapporto, L., Pansolli, C. & Turillazzi, S. (2004) Hibernation clustering and its consequences for associative nest foundation in *Polistes dominulus* (Hymenoptera Vespidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **56**. doi:10.1007/s00265-004-0800-y
- Darrouzet E., Gévar J. & Dupont S. (2014) A scientific note about a parasitoid that can parasitize the yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax*, in Europe. *Apidologie* **46**, 130-132.
- Darrouzet, E., Gévar, J., Guignard, Q. & Aron, S. (2015) Production of early diploid males by european colonies of the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax*. *PLOS ONE* **10**, e0136680. doi:10.1371/journal.pone.0136680
- Deby, L. & Tshinkel, R. (1986) Allocation of liquid food to larvae via trophallaxis in colonies of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Mental* 1990, 1994.
- Dechaume-Moncharmont, F.-X., Dornhaus, A., Houston, A.I., McNamara, J.M., Collins, E.J. & Franks, N.R. (2005) The hidden cost of information in collective foraging. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **272**, 1689–1695. doi:10.1098/rspb.2005.3137
- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P., Brun, F., Bagnis, C., Fourier, J. & Gauthier, M. (2011) Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* **20**, 429. doi:10.1007/s10646-011-0594-4
- DeBach, P. & Rosen, D. (1991) Biological control by natural enemies. Cambridge University Press. CUP Archive. Pp75-84.
- De Kouassi, M. (2001) Les possibilités de la lutte microbiologique, emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo* 2. <https://vertigo.revues.org/4091>; Consulté le 07/08/2017.
- Demichelis, S., Manimo, A. & Porporato, M. (2013) Trovato il primo nido di *Vespa velutina* a Vallecrosia (IM). In: Comunicato Stampa. Università Degli Studi di Torino, Turin.
- Den Boer, S. P. A., Baer, B. & Boomsma, J. J. (2010) Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects. *Science* **327**, 1506-1509.
- Dew, H.E. & Michener, C.D. (1981) Division of labor among workers of *Polistes metricus* (Hymenoptera: Vespidae): Laboratory foraging activities. *Ins. Soc* **28**, 87–101. doi:10.1007/BF02223625

Références

- Dich, J., Zahm, S.H., Hanberg, A. & Adami, H.-O. (1997) Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control* **8**, 420–443. doi:10.1023/A:1018413522959
- Dirks, T.F. & Sternburg, J.G. (1972) Male reproductive system of three species of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **1**, 315–320.
- Dornhaus, A. & Chittka, L. (1999) Insect behaviour: Evolutionary origins of bee dances. *Nature* **401**, 38–38. doi:10.1038/43372.
- Dornhaus, A., Brockmann, A. & Chittka, L. (2003) Bumble bees alert to food with pheromone from tergal gland. *J. Comp. Physiol. A* **189**, 47–51. doi:10.1007/s00359-002-0374-y.
- Doums, C., Moret, Y., Benelli, E. & Schmid-Hempel, P. (2002) Senescence of immune defence in *Bombus* workers. *Ecological Entomology* **27**, 138–144.
- Du Buysson, R. (1903). Monographie des guêpes ou *Vespa*. *Annales de la Société Entomologique de France* **72**, 260-88.
- Du Buysson, R. (1904 [1905]) Monographie des Guêpes ou *Vespa*. *Annales de la Société Entomologique de France* **73**, 485-634.
- Duchateau, M. J. & Marriën, J. (1995) Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux* **42**, 255-266.
- Dukas, R. (1998) Cognitive ecology. The evolutionary ecology of information processing and decision making. R Dukas (Ed.), University of Chicago Press, pp. 129-174.
- Dvořák, L. (2006) Oriental Hornet *Vespa orientalis* Linnaeus, 1771 found in Mexico (Hymenoptera, Vespidae, Vespinae). *Entomological Problems* **36**, 80.
- Eck, R. (1993) Die Verbreitung der *Dolichovespula sylvestris* im Vergleich mit den übrigen europäischen Arten der Gattung (Hym.: Vespidae). *Mitt. Deutsch. Ges. Allg. Angewand. Ent.* **8**, 919-921.
- Edwards, R. (1980) Social wasps. Their biology and control. Rentokil Limited, W. Sussex, England.
- El Agoze, M., Drezen, J.M., Renault, S. & Periquet, G. (1994) Analysis of the reproductive potential of diploid males in the wasp *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Bulletin of Entomological Research* **84**, 213. doi:10.1017/S0007485300039717.
- Elbetieha, A., Da'as, S.I., Khamas, W. & Darmani, H. (2001) Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **41**, 522–528. doi:10.1007/s002440010280
- Erlandson S. (1988). The distribution of the hornet (*Vespa c. crabro* L.) in northwestern Europe. *Entomol. Tidskrift* **109**, 155–159.
- Fabre, J.H. (1882) Souvenirs entomologiques études sur l'instinct et les moeurs des insectes, 2e Sér., Delagrave, Paris.

Références

- Fargues, J., Robert, P.H. (1985) Persistence of conidia of 4 entomopathogenic Hyphomycetes in soil, *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor, *Nomuraea rileyi* (F) Samson and *Paecilomyces fumosoroseus* Wize, in controlled conditions. *Agronomie* 5, 73–80.
- Fernandes, E.K.K., Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L. & Roberts, D.W. (2015) Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*, 19 May 2015. DOI: 10.1007/s00294-015-0492-z
- Ferron, P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual review of entomology* 23, 409–442.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J. & Báó, S.N. (2008) Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscopus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39, 1271–1280. doi:10.1016/j.micron.2008.03.005
- Fjerdingstad E.J. & Boomsma, J.J., (1998) Multiple mating increases the sperm stores of *Atta colombica* leafcutter ant queens. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42, 257–61.
- Fletcher, D.J. & Ross, K.G. (1985) Regulation of reproduction in eusocial Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 30, 319-343
- Flynn, R. (2008) A Complex Buzz. *Agricultural Research*, 8-11.
- Forsyth, A. (1978) Studies on the behavioral ecology of polygynous social wasps. Ph.D. thesis, Harvard University, Cambridge, Mass. 226 pp.
- Foster, K.R., Seppä, P., Ratnieks, F.L.W. & Thorén, P.A. (1999) Low paternity in the hornet *Vespa Crabro* indicates that multiple mating by queens is derived in vespine wasps. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 46, 252–57.
- Foster, K. R. & Ratnieks, F.L.W. (2000) Facultative worker policing in a wasp. *Nature* 407, 692-693.
- Foster, R.L., Brunskill, A., Verdirame, D. & O'Donnell, S. (2004) Reproductive physiology, dominance interactions, and division of labour among bumble bee workers. *Physiological Entomology* 29, 327-334
- Fox, J. & Weisberg, S. (2011) An R companion to applied regression, Second Edition. Thousand Oaks: Sage Publications. 472 p.
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E. & De Benedictis, G. (2000) Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 908, 244–254.
- Franco, K., Rodríguez, S., Cervantes, J. & Barranco, J. (2012) Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente, Mexico* 12, 143-160.
- Franklin, D.N., Brown, M.A., Datta, S., Cuthbertson, A.G., Budge, G.E. & Keeling, M.J. (2017) Invasion dynamics of Asian hornet, *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae): a case study of a commune in south-west France. *Applied Entomology and Zoology* 52, 221-229.

Références

- Gadagkar, R. & Joshi, N.V. (1983) Quantitative ethology of social wasps : time-activity budgets and caste differentiation in *Ropalidia marginata* (Lep.) (Hymenoptera: vespidae). *Animal behavior* **31**, 26-31.
- Galliot G. & Azoeuf, P. (1979). Etude quantitative des transferts de nourriture entre ouvrières d'âge connu chez l'abeille domestique (*Apis mellifica mellifica* L.). *Insectes sociaux* **26**, 39-49.
- Galliot, G., Montagner, H. & Azoeuf P. (1982). Etude quantitative des transferts de nourriture entre ouvrières et mâles chez l'abeille domestique (*Apis mellifica* L.). *Insectes sociaux* **29**, 268-279.
- Galiulin, R.V., Bashkin, V.N. & Galiulina, R.A. (2002) Review: Behavior of persistent organic pollutants in the air-plant-soil system. *Water, Air, & Soil Pollution* **137**, 179–191. doi:10.1023/A:1015558526154
- García-Fernández, P., Santiago-Álvarez, C. & Quesada-Moraga, E. (2008) Pathogenicity and thermal biology of mitosporic fungi as potential microbial control agents of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* **39**, 662–673. doi:10.1051/apido:2008049
- Garnas, R.J., Auger-Rozenberg, M.A., Roques, A., Bertelsmeier, C., Wingfield, M.J., Saccaggi, D.L., Roy, H.E. & Slippers, B. (2016) Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. *Biological Invasions* **18**, 935–952. doi:10.1007/s10530-016-1082-9
- Gautrais, J., Theraulaz, G., Deneubourg, J.-L. & Anderson, C. (2002) Emergent Polyethism as a Consequence of Increased Colony Size in Insect Societies. *Journal of Theoretical Biology* **215**, 363–373. doi:10.1006/jtbi.2001.2506
- Gerecke, A.C., Schärer, M., Singer, H.P., Müller, S.R., Schwarzenbach, R.P., Sägesser, M., Ochsenbein, U. & Popow, G. (2002) Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants—current situation and reduction potential. *Chemosphere* **48**, 307–315. doi:10.1016/S0045-6535(02)00080-2
- Gévar, J., Bagnères, A.G., Christidès, J.P. & Darrouzet, E. (2017) Chemical heterogeneity in inbred European population of the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax*. *Journal of Chemical Ecology*. doi:10.1007/s10886-017-0874-4
- Goettel, M.S. & Inglis, G.D. (1997) Fungi: Hyphomycetes. In “A Manual of Techniques in Insect Pathology” (L. Lacey, Ed.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 213–249
- Goldarazena, A., de Heredia, I. P., Romon, P., Iturrondobeitia, J. C., Gonzalez, M. and Lopez, S. (2015), Spread of the yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* du Buysson (Hymenoptera: Vespidae) across Northern Spain. *EPPO Bull*, **45**, 133–138. doi:10.1111/epp.12185
- Gordon, D.M. (1996) The organization of work in social insect colonies. *Nature* **380**, 121–24.
- Gordon, D.M. (2010) Ant encounters. Interaction networks and colony behavior. Princeton University Press.

Références

- Gotoh, A., Billen, J., Hashim, R. & Ito, F. (2008) Comparison of spermatheca morphology between reproductive and non-reproductive females in social wasps. *Arthropod Structure & Development* **37**, 199–209. doi:10.1016/j.asd.2007.11.001
- Gould JL (1986) The locale map of honey bees: do insects have cognitive maps? *Science* **232**, 861–863.
- Gould, J.L. (1990) *Honey bee cognition*. *Cognition* **37**, 83–104.
- Goulson, D. & Stout, J.C. (2001) Homing ability of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* **32**, 105–111.
- Goulson, D. & Osborne, J.L. (2009) Foraging range and the spatial distribution of worker bumble bees. In S. Jarau and M. Hrncir (Eds.), Food exploitation by social insects, ecological, behavioral, and theoretical approaches Boca Raton, FL: CRC Press. pp 96–111.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E.L. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**, 1255957–1255957. doi:10.1126/science.1255957.
- Gracielle., M.S., Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J. & Báo, S.N (2009) Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron* **40**, 419–425.
- Greenleaf, S.S., Williams, N.M., Winfree, R. & Kremen, C. (2007) Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia* **153**, 589–596. doi:10.1007/s00442-007-0752-9.
- Grosso-Silva, J.M. & Maia, M. (2012) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Vespidae), new species for Portugal. *Arquivos entomológicos* **6**, 53–54.
- Grüter, C. & Farina, W.M. (2009) The honeybee waggle dance: can we follow the steps? *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 242–247. doi:10.1016/j.tree.2008.12.007
- Hagler, J. R., Machtley, S. A. & Blackmer, F. (2015) A potential contamination error associated with insect protein mark-capture data. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **154**, 28–34. doi:10.1111/eea.12252.
- Hagler, J.R. (2016) A false positive food chain error associated with a generic predator gut content ELISA. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **161**, 187–192.
- Hajek, A.E. & St Leger, R.J. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology* **39**, 293–322.
- Harpur, B.A., Sobhani, M., Zayed, A. (2013) A review of the consequences of complementary sex determination and diploid male production on mating failures in the Hymenoptera. *Entomol. Exp. Appl.* **146**, 156–164. doi:10.1111/j.1570-7458.2012.01306.x
- Harris, A.C., 1979. Occurrence and nesting of the yellow oriental paper wasp, *Polistes olivaceus* (Hymenoptera: Vespidae), in New Zealand. *New Zealand Entomologist* **7**, 41–44. doi:10.1080/00779962.1979.9722327

Références

- Harris, R.J. (1991) Diet of the wasps *Vespula vulgaris* and *V. germanica* in honeydew beech forest of the south island. *New Zealand Journal of Ecology* **18**, 159-170.
- Harris, R.J., Moller, H., Tilley, J.A.V. (1991) Weather related differences in attractiveness of protein foods to *Vespula* wasps. *New Zealand journal of ecology* **15**: 167-170.
- Harris, R., Harcourt, S.J., Glare, T.R., Rose, E.A.F. & Nelson, T.J. (2000) Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential for wasp control. *Journal of Invertebrate Pathologie* **75**, 251-258. DOI: 10.1006/jipa.2000.4928
- Hartl, D.L. (1971) Some aspects of natural selection in arrhenotokous populations. *American Zoologist* **11**, 309-325.
- Harvey, C. (2015) Integrated Pest Management in temperate horticulture: seeing the wood for the trees. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **10**. doi:10.1079/PAVSNNR201510028
- Hayes, R.O. (1953) Determination of a physiological saline solution for *Aedes aegypti* (L.). *Journal of Economic Entomology* **46**, 624-627.
- He, X., Wang, W., Qin, Q., Zeng, Z., Zhang, S. & Barron, A. (2012) Assessment of flight activity and homing ability in Asian and European honey bee species, *Apis cerana* and *Apis mellifera*, measured with radio frequency tags. *Apidologie* **44**, 38-51.
- Heidinger, I., Meixner, M., Berg, S. & Büchler, R. (2014) Observation of the mating behavior of honey bee (*Apis mellifera* L.) queens using Radio-Frequency Identification (RFID): Factors influencing the duration and frequency of nuptial flights. *Insects* **5**, 513–527. doi:10.3390/insects5030513
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in Honey bees. *Science* **336**, 348–350. doi:10.1126/science.1215039.
- Henry, M., Cerrutti, N., Aupinel, P., Decourtye, A., Gayraud, M., Odoux, J.-F., Pissard, A., Rüger, C. & Bretagnolle, V. (2015) Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**, 20152110. doi:10.1098/rspb.2015.2110
- Hicks, B.J. (2016) Optimization of *Beauveria bassiana* in a spray formulation against *Choristoneura fumiferana*. *Canadian Journal of Forest Research* **46**, 543–547. doi:10.1139/cjfr-2015-0435
- Hölldobler, B. (1978) Ethological aspects of chemical communication in ants. *Advances in the Study of Behavior* **8**, 75–115. doi:10.1016/S0065-3454(08)60132-1
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990) *The Ants*. Belknap Press, Cambridge, Mass. 732 pp
- Holway, D.A., Suarez, A.V. & Case, T.J. (1998) Loss of intraspecific aggression in the success of a widespread invasive social insect. *Science* **282**: 949–952.
- Holway, D.A. & Suarez, A.V. (1999) Animal behavior: an essential component of invasion biology. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 328–330.

Références

- Houston, A.I. & McNamara, J.M. (1985) A general theory of central place foraging for single-prey loaders. *Theoretical Population Biology* **28**, 233–262.
- Howard, K.J. & Jeanne, R.L. (2005) Shifting foraging strategies in colonies of the social wasp *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae). *Behav Ecol Sociobiol* **57**, 481–489. doi:10.1007/s00265-004-0871-9
- Howarth, F.G. (1985) Impacts of alien land arthropods and mollusks on native plants and animals in Hawaii. Hawaii's terrestrial ecosystems: preservation and management. *University of Hawaii Press, Honolulu* 149–179.
- Hudina, S., Hock, K. & Žganec, K. (2014) The role of aggression in range expansion and biological invasions. *Current Zoology* **60**, 401–409.
- Hughes, C.R. & Strassmann, J.E. (1988) Age is more important than size in determining dominance among workers in the primitively eusocial wasp, *Polistes instabilis*. *Behaviour* **107**, 1–15.
- Hunt, J.H., Rossi, A.M., Holmberg, N.J., Smith, S.R. & Sherman, W.R. (1998) Nutrients in Social Wasp (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae) Honey. *Annals of the Entomological Society of America* **91**, 466–472. doi:10.1093/aesa/91.4.466
- Hunt, J.H., O'donnell, S., Chernoff, N. & Brownie, C. (2001) Observations on Two Neotropical Swarm-Founding Wasps, *Agelaia yepocapa* and *A. panamaensis* (Hymenoptera: Vespidae). *Annals of the Entomological Society of America* **94**, 555–562. doi:10.1603/0013-8746(2001)094[0555:OOTNSF]2.0.CO;2
- Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F., Evans, H.F. & Crook, N.E. (1998) Insect viruses and pest management. Ed John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Ignoffo, C.M. (1992). Environmental Factors Affecting Persistence of Entomopathogens. *The Florida Entomologist*, **75**(4):516-525.
- Ioriatti, C., Anfora, G., Tasin, M., De Cristofaro, A., Witzgall, P. & Lucchi, A. (2011) Chemical Ecology and Management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology* **104**, 1125–1137. doi:10.1603/EC10443
- Inglis, G.D., Goettel, M.S. & Johnson, D.L. (1995) Influence of Ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biological Control* **5**, 581–590.
- Inglis, G.D., Duke, G.M., Kawchuk L.M. & Goettel, M.S. (1999) Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory Grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biological Control* **14**, 111–120.
- Inglis, G.D., Ivie, T.J., Duke, G.M. & Goettel, M.S. (2000) Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and Colorado Potato Beetle larvae. *Biological Control* **18**, 55–64. doi:10.1006/bcon.1999.0806
- Ishay, J. & Ikan, R. (1967) Glucogenesis in the oriental hornet *Vespa orientalis*. *Ecology* **49**, 169–171.

Références

- Ishay, J. & Ikan, R. (1968) Food exchange between adults and larvae in *Vespa orientalis* F. *Animal Behavior* **16**, 298 – 303.
- Ishay, J.S. & Kirshboim, S. (2000) Ultraviolet B. light stimulates hornet activities-a review. *Semiconductor science and technology* **15**, 704.
- Ishay, J.S. (2004) Hornet flight is generated by solar energy: UV irradiation counteracts anesthetic effects. *Journal of Electron Microscopy* **53**, 623–633.
- Jaccoud, D. B., Hughes, W. O. H. & Jackson, C. W. (1999) The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **93**, 51–61. doi:10.1046/j.1570-7458.1999.00561.x
- Jackson, T.A., Huger, A.M. & Glare, T.R. (1993) Pathology of amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **61**, 123-130.
- Jackson, S.H., Cowan-Ellsberry, C.E. & Thomas, G. (2009) Use of quantitative structural analysis to predict fish bioconcentration factors for pesticides. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **57**, 958–967. doi:10.1021/jf803064z
- Jacobson, M., Reed, D.K., Crystal, M.M., Moreno, D.S. & Soderstrom, E.L. (1978) Chemistry and biological activity of insect feeding deterrents from certain weed and crop plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **24**, 448–457. doi:10.1111/j.1570-7458.1978.tb02805.x
- Jaffé, R., Garcia-Gonzalez, F., den Boer, S.P.A., Simmons, L.W. & Baer., B. (2012) Pattern of paternity skew among polyandrous social insects: what can they tell us about the potential for sexual selection? *Evolution* **66**, 3778-3788.
- Jandt, J.M. & Jeanne, R.L. (2005) German Yellowjacket (*Vespula germanica*) foragers use odors inside the nest to find carbohydrate food sources. *Ethology* **111**, 641–651. doi:10.1111/j.1439-0310.2005.01088.x
- Jany, K.D., Haug, H. & Ishay, J. (1978) Trypsin-like endopeptidases from the midguts of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. *Insect Biochemistry* **8**, 221-230.
- Jeanne, R.L. (1991) The swarm-founding Polistinae. In: Ross K.G., Matthews R.W. (eds) *The social biology of wasps*. Comstock, Ithaca, pp 191-231.
- Jeanne, R.L. & Taylor, B.J. (2009) Individual and social foraging in social wasps. Food exploitation by social insects: ecological, behavioral, and theoretical approaches, Ed. Taylor and Francis Group. Pp59-79.
- Jeanne, R.L. & Bermúdez, E.G.C. (1980) Reproductive behavior of a male neotropical social wasp, *Mischocyttarus drewseni* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 271–276.
- Jeanson, R., Fewell, J. H. & Gorelick, R. (2007) Emergence of increased division of labor as a function of group size. *Behav Ecol Sociobiol* **62**, 289-298.

Références

- Kacelnik, A. Houston, A.I. & Schmid-Hempel, P. (1986) Central place foraging in honey bees: the effect of travel time and nectar flow on crop filling. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **19**, 19-24.
- Kanga, L.H.B., Jones, W.A. & James, R.R. (2003) Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of economic entomology* **96**, 1091–1099.
- Karsai, I., Péntzes, Z. & Wenzel, J.W. (1996) Dynamics of colony development in *Polistes dominulus*: a modeling approach. *Behav Ecol Sociobiol* **39**, 97–105. doi:10.1007/s002650050271
- Kasper, M.L., Reeson, A.F., Mackay, D.A. & Austin, A.D. (2008) Environmental factors influencing daily foraging activity of *Vespula germanica* (hymenoptera, Vespidae) in Mediterranean Australia. *Insectes Sociaux* **55**, 288–295. doi:10.1007/s00040-008-1004-7
- Kasuya, E. (1983) Social behaviour of early males of Japanese paper wasp, *Polistes chinensis antennalis* (Hymenoptera: Vespidae). *Researches on population ecology* **25**, 143-149.
- Keeling, M.J., Franklin, D.N., Datta, S., Brown, M.A. & Budge, G.E. (2017) Predicting the spread of the Asian hornet (*Vespa velutina*) following its incursion into Great Britain. *Scientific Reports* **7**. doi:10.1038/s41598-017-06212-0
- Kelber, A., Jonsson, F., Wallén, R., Warrant, E., Kornfeldt, T. & Baird, E. (2011) Hornets can fly at night without obvious adaptations of eyes and ocelli. *PLoS ONE* **6**, e21892. doi:10.1371/journal.pone.0021892
- Keller, L. & Reeve, H.K. (1994) Genetic Variability, Queen Number, and Polyandry in Social Hymenoptera. *Evolution* **48**, 694-704. doi: 10.2307/2410479.
- Kennedy, P.J. & Young, M.R. (1993) Radar tracking the movements of ground beetles in a farmland mosaic. *Aberdeen Letters in Ecology* **6**, 18-19.
- Kim, J.K., Choi, M.B. & Moon, T. Y. (2006) Occurrence of *Vespa velutina* Lepeletier from Korea, and a revised key for Korean *Vespa* species (Hymenoptera: Vespidae). *Entomological Research* **36**, 112-115.
- Mc Kinlay, R., Plant, J.A., Bell, J.N.B. & Voulvoulis, N. (2008) Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environment International* **34**, 168–183. doi:10.1016/j.envint.2007.07.013
- Kissling, W.D., Pattemore, D.E. & Hagen, M. (2014) Challenges and prospects in the telemetry of insects. *Biological Reviews* **89**, 511-530.
- Kluser, S., Neumann, P., Chauzat, M.P., Pettis, J.S., Peduzzi, P., Witt, R., Fernandez, N. et al. (2010) Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators. <http://archive-ouverte.unige.ch/unige:32258>.

Références

- Kovacs, J. & Goodisman, M.A.D. (2012) Effects of size, shape, genotype, and mating status on queen overwintering survival in the social wasp *Vespula maculifrons*. *Environmental Entomology* **41**, 1612-1620. doi: 10.1603/EN12023
- Kpindou, O.K.D., Sinsin, B. & Kooyman, C. (2007) Impact de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, sur les hyménoptères : cas de *Anagyrus lopezi* (De Santis) et de *Cotesia Plutellae* (Kurdjumov). *Annales des Sciences Agronomiques* **9**. doi:10.4314/asab.v9i1.43221
- Krieger, M.J.B., Ross, K.G., Chang, C.W.Y. & Keller L. (1999) Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Heredity* **82**, 142-150.
- Krzeminski, S.F., Gilbert, J.T. & Ritts, J.A. (1977) A pharmacokinetic model for predicting pesticide residues in fish. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* **5**, 157-166. doi:10.1007/BF02220898
- Kwak, E.S., Just, A., Whyatt, R. & Miller, R.L. (2009) Phthalates, pesticides, and bisphenol-a exposure and the development of nonoccupational asthma and allergies: How valid are the links? *Open Allergy J* **2**, 45-50. doi:10.2174/1874838400902010045
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M.S. (2015) Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* **132**, 1-41.
- Lacoume, S., Bressac, C. & Chevrier, C. (2009) Male hypofertility induced by Paraquat consumption in the non-target parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Biological control* **49**, 214-218.
- Landolt, P.J., Monzon Sierra, J., Unruh, T.R. & Zack, R.S. (2010) A new species of *Vespula*, and first record of *Vespa crabro* L. (Hymenoptera: Vespidae) from Guatemala, Central America. *Zootaxa* **2629**, 61-68.
- Langowska, A., Ekner, A., Skorka, P., Tobolka, M. & Tryjanowski, P. (2010) Nest-site tenacity and dispersal patterns of *Vespa crabro* colonies located in bird boxes. *Sociobiology* **56**, 375-382.
- LeBlanc, G.A., Bain, L.J. & Wilson, V.S. (1997) Pesticides: multiple mechanisms of demasculinization. *Molecular and cellular endocrinology* **126**, 1-5.
- Le Conte, Y., Ellis, M. & Ritter, W. (2010) Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie* **41**, 353-363.
- Le Masne, G. (1980) Remarques sur les relations entre adultes et stades jeunes chez les insectes sociaux. *Reproduction Nutrition Développement* **20**, 779-790.
- Le Moult, L. (1890) le parasite du hanneton. CR de l'Académie des Sciences, p. 653-655
- Letsinger, J. T. & Gromko, M. H. (1985) The role of sperm numbers in sperm competition and female remating in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* **66**, 195-202.
- Liebert, A.E., Wilson-Rich, N., Johnson, C.E. & Starks, P.T. (2010) Sexual interactions and nestmate recognition in invasive populations of *Polistes dominulus* wasps. *Insectes Sociaux* **57**, 457-463.

Références

- Lihoreau, M., Raine, N.E., Reynolds, A.M., Stelzer, R.J., Lim, K.S., Smith, A.D., Osborne, J.L. & Chittka, L. (2012) Radar tracking and motion-sensitive cameras on flowers reveal the development of pollinator multi-destination routes over large spatial scales. *PLoS Biology* **10**, e1001392. doi:10.1371/journal.pbio.1001392.
- Lombaert, E., Estoup, A., Facon, B., Joubard, B., Grégoire, J.-C., Jannin, A., Blin, A. & Guillemaud, T. (2014) Rapid increase in dispersal during range expansion in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Journal of Evolutionary Biology* **27**, 508–517. doi:10.1111/jeb.12316
- Long, R. F., Corbett, A., Lamb, C., Reberg-Horton, C., Chandler, J., & Stimmann, M. (1998). Beneficial insects move from flowering plants to nearby crops. *California Agriculture* **52**, 23–26. doi:10.3733/ca.v052n05p23.
- Loope, K.J., Chien, C. & Juhl, M. (2014) Colony size is linked to paternity frequency and paternity skew in yellowjacket wasps and hornets. *BMC Evolutionary Biology* **14**, 277.
- López, S., González, M. & Goldarazena, A. (2011) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae): first records in Iberian Peninsula. *EPPO Bulletin* **41**, 439–441.
- Lord, J.C. (2001) Response of the Wasp *Cephalonomia tarsalis* (Hymenoptera: Bethyridae) to *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as Free Conidia or Infection in Its Host, the Sawtoothed Grain Beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Biological Control* **21**, 300–304. doi:10.1006/bcon.2001.0942
- Loreto, R.G. & Hughes, D.P. (2016) Disease dynamics in ants, in: *Advances in genetics*. Elsevier, pp. 287–306.
- Mack, R.N., Simberloff, D., Mark Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M. & Bazzaz, F.A. (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* **10**, 689–710. doi:10.1890/1051-0761(2000)010[0689:BICEGC]2.0.CO;2.
- Mack, P. D., Priest, N.K. & Promislow, D.E.L. (2003) Female age and sperm competition: last-male precedence declines as female age increases. *Proceedings of the Royal Society B* **270**, 159–165.
- Makino, S. (2016) Post-hibernation ovary development in queens of the Japanese giant hornet *Vespa mandarinia* (Hymenoptera: Vespidae). *Entomological Science*, doi: 10.1111/ens.12205.
- Makino, S. & Yamane, S. (1997) Nest contents and colonial adult productivity in a common hornet, *Vespa simillima simillima* Smith, in Northern Japan (Hymenoptera, Vespidae). *Japanese Journal of Entomology* **65**, 47-54.
- Makino, S., Ichi, Kawashima, M. & Kosaka, H. (2011) First record of occurrence of *Xenos moutoni* (Strepsiptera; Stylopidae), an important parasite of hornets (Hymenoptera: Vespidae: Vespa), in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **14**, 137–139. doi:10.1016/j.aspen.2010.09.001
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H. & Dallai, R. (2009) Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod Structure Development* **38**, 54-59.

Références

- Manley, R., Boots, M. & Wilfert, L. (2015) Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *Journal of Applied Ecology*, **52**, 331-340. DOI: 10.1111/1365-2664.12385
- Marden, J.H. (2000) Variability in the size, composition, and function of insect flight muscles. *Annual Review of Physiology* **62**, 157–178.
- Markin, G.P. (1970) Food distribution within laboratory colonies of the argentine ant, *Tridomyrmex humilis* (Mayr). *Insectes sociaux* **2**, 127-158.
- Marques, G. (2012). Biodiversidade funcional do solo: qual o papel dos fungos entomopatogénicos na protecção da vinha? CITAB Presentation, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal 28th October.
- Martin, S.J. (1991) A simulation model for colony development of the hornet *Vespa simillima* (Hymenoptera, Vespidae). *Japan Journal of Entomology* **59**, 105-124.
- Martin, S.J. (1992) Development of the embryo nest of *Vespa affinis* (Hymenoptera: Vespidae) in Southern Japan. *Insectes Sociaux* **39**, 45-57.
- Martin, S.J. (1993) Weight changes in adult hornets, *Vespa affinis* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes sociaux* **40**, 363–368.
- Martin, J.C., Brinquin, A.S., Morel, E., Tabone, E., & Guerin, M. (2015). New regulation tool for borer boxwood *Cydalima perspectalis* (Walker): a highly attractive pheromone and trap kit. In *5th Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives de Protection des Plantes*, 11-13 mars, 2015, Nouveau Siècle, Lille, France (pp. 701-709). Association Française de Protection des Plantes (AFPP).
- Martins, G.F., Serrão, J.E. & Schmidt, K. (2005). Notes on the spermatheca of Vespidae and Sphecidae (Hymenoptera). *Sociobiology* **45**, 1-9.
- Martson, L.V. & Voronina, V.M. (1976) Experimental study of the effect of a series of phosphoro organic pesticides (Dipterex and Imidan) on embryogenesis. *Environmental Health Perspectives* **13**, 121–124.
- Maschwitz, U., Beier, W., Dietrich, I. & Keidel, W. (1974) Futtermverständnis bei Wespen der Gattung Paravespila. *Naturwissenschaften* **11**:506.
- Matsuura, M. (1966) Notes on the hibernating habits of the *Vespa* in Japan (Hymenoptera, Vespidae). *Kontyû* **34**, 52-67.
- Matsuura, M. (1984) Comparative biology of the five Japanese species of the Genus *Vespa* (Hymenoptera: Vespidae). *Bull. Fac. Agr. Mie Univ.* **69**, 1-151.
- Matsuura, M. (1988) Ecological study on Vespine wasps (Hymenoptera: Vespidae) attacking Honeybee colonies. 1. Seasonal changes in the frequency of visits to apiaries by vespine wasps and damages inflicted, especially in the absence of artificial protection. *Applied Entomology and Zoology* **23**, 428-440.

Références

- Matsuura, M. (1991) *Vespa* and *Provespa*. In “The social biology of wasps”. Ross KG & Matthews RW, eds. Ithaca, NY: Cornell Univ. Press. pp 232–262.
- Matsuura, M. & Sakagami, S.F. (1973) A bionomic sketch of the giant Hornet, *Vespa mandarinia*, a serious pest for Japanese apiculture. *Journal of The Faculty of Science Hokkaido University* **19**, 125-162.
- Matsuura, M. & Yamane, S. (1990) Biology of vespine wasps. Berlin: Springer-Verlag.
- Matsuura, M., Yamane, S. & Sakagami, S.F. (1990) Chapter 5: Foraging behavior. Biology of the vespine wasps. Springer, Berlin u.a. pp98-138.
- Mburu, D.M., Maniania, N.K. & Hassanali, A. (2013) Comparison of volatile blends and nucleotide sequences of two *Beauveria bassiana* isolates of different virulence and repellency towards the termite *Macrotermes michealseni*. *Journal of Chemical Ecology* **39**, 101–108. doi:10.1007/s10886-012-0207-6
- Mburu, D.M., Ndung'u, M.W., Maniania, N.K. & Hassanali, A. (2011) Comparison of volatile blends and gene sequences of two isolates of *Metarhizium anisopliae* of different virulence and repellency toward the termite *Macrotermes michaelsoni*. *Journal of Experimental Biology* **214**, 956–962. doi:10.1242/jeb.050419
- Mburu, D.M., Ochola, L., Maniania, N.K., Njagi, P.G.N., Gitonga, L.M., Ndung'u, M.W., Wanjoya, A.K. & Hassanali, A. (2009) Relationship between virulence and repellency of entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the termite *Macrotermes michaelsoni*. *Journal of Insect Physiology* **55**, 774–780. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.04.015
- Meyling, N.V. (2007) Methods for isolation of entomopathogenic fungi from soil environment. Laboratory manual, Department of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen.
- Meyling, N.V. & Eilenberg, J. (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* **43**, 145–155. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.07.007
- Milanesio, D., Saccani, M., Maggiora, R., Laurino, D. & Porporato, M. (2016) Design of an harmonic radar for the tracking of the Asian yellow-legged hornet. *Ecology and Evolution* **6**, 2170–2178. doi:10.1002/ece3.2011
- Milanesio, D., Saccani, M., Maggiora, R., Laurino, D. & Porporato, M. (2017) Recent upgrades of the harmonic radar for the tracking of the Asian yellow-legged hornet. *Ecology and Evolution* **7**, 4599–4606. doi:10.1002/ece3.3053
- Mills, L.S., Soulé, M.E. & Doak, D.F. (1993) The keystone-species concept in ecology and conservation. *BioScience* **43**, 219-224.

Références

- Moino, A. & Sousa Cavallanti, R. (2011) Hongos y nematodos entomopatógenos. Manual de biología de suelos tropicales. Ed. del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Mexico. pp. 287-295.
- Moller, H. (1990) Wasps kill nestling birds. *Notornis* **37**, 76-77.
- Moller, H. (1996) Lessons for invasion theory from social insects. *Biological conservation* **78**, 125–142.
- Moller, H., Beggs, J.R., Tilley, J.A.V., Toft, R.J., Wilson, N.J. & Alspach, P.A. (1990) Ecology and control of wasps populations in New Zealand. *DSIR Land Resources Contract Report to the department of Conservation*.
- Monceau, K., Bonnard, O. & Thiéry, D. (2012) Chasing the queens of the alien predator of honeybees: A water drop in the invasiveness ocean. *Open Journal of Ecology* **02**, 183–191. doi:10.4236/oje.2012.24022
- Monceau, K., Bonnard, O., Thiéry, D. (2013a) Relationship between the age of *Vespa Velutina* workers and their defensive behaviour established from colonies maintained in the Laboratory. *Insectes Sociaux* **60**, 437–44.
- Monceau, K., Maher, N., Bonnard, O. & Thiéry, D. (2013b) Predation dynamics study of the recently introduced honeybee killer *Vespa velutina*: learning from the enemy. *Apidologie* **44**, 209–221.
- Monceau, K., Arca, M., Leprière, L., Mougél, F., Bonnard, O., Silvain, J.F., Maher, N., Arnold, G. & Thiéry, D. (2013c) Native prey and invasive predator patterns of foraging activity: the case of the yellow legged hornet predation at European honeybee hives. *PLoS One* **8**:e66492.
- Monceau, K., Bonnard, O. & Thiéry, D. (2014a) *Vespa Velutina*: A new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal of Pest Science* **87**, 1–16.
- Monceau, K., Bonnard, O., Moreau, J. & Thiéry, D. (2014b) Spatial distribution of *Vespa velutina* individuals hunting at domestic honeybee hives: heterogeneity at a local scale: Repartition of *Vespa velutina* on hives. *Insect Science* **21**, 765–774. doi:10.1111/1744-7917.12090
- Monceau, K., Maher, N., Bonnard, O. & Thiéry, D. (2015a) Evaluation of competition between a native and an invasive hornet species: do seasonal phenologies overlap? *Bulletin of Entomological Research* **105**, 462–469. doi:10.1017/S0007485315000280
- Monceau, K., Moreau, J., Poidatz, J., Bonnard, O. & Thiéry, D. (2015b) Behavioral syndrome in a native and an invasive hymenoptera species: Behavioral syndrome in hymenoptera species. *Insect Science* **22**, 541–548. doi:10.1111/1744-7917.12140
- Monceau, K. & Thiéry, D. (2017) *Vespa velutina* nest distribution at a local scale: An eight-year survey of the invasive honeybee predator. *Insect Science* **24**, 663–674. doi:10.1111/1744-7917.12331.
- Monceau, K., Tourat, A., Arca, M., Bonnard, O., Arnold, G. & Thiéry, D. (2017) Daily and seasonal extranidal behaviour variations in the invasive yellow-legged hornet, *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of Insect Behavior* **30**, 220-230.

Références

- Monceau, K. & Thiéry, D. (2017c) *Vespa velutina* : current situation and perspectives. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LXIV*, 137-142. (In press)
- Mônica, C., Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2005) Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae): Fate of the atypical spermatids. *Caryologia* **58**, 183–88.
- Montagner, H. (1963) Etude préliminaire des relations entre les adultes et le couvain chez les guêpes sociales du genre *Vespa* au moyen d'un radio-isotope. *Insectes sociaux* **2**, 153-166.
- Montagner, H. & Courtois, G. (1963) Données nouvelles sur le comportement alimentaire et les échanges trophallactiques chez les guêpes sociales . *C.R.Acad. Sci. Paris* **256**, 4092-4094 .
- Montagner, H. (1964) Etudes du comportement alimentaire et des relations trophallactiques du mâle au sein de la société de guêpes. *Insectes sociaux* **11**, 301-316 .
- Mooney, H.A. & Cleland, E.E. (2001) The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5446-5451. doi: 10.1073/pnas.091093398.
- Moors, L., Spaas, O., Koeniger, G & Billen, J. (2005) Morphological and ultrastructural changes in the mucus glands of *Apis mellifera* drones during pupal development and sexual maturation. *Apidologie* **36**, 245-254.
- Moreau, M., Arrufat, P., Latil, G. & Jeanson, R. (2011) Use of radio-tagging to map spatial organization and social interactions in insects. *Journal of Experimental Biology* **214**, 17–21.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. (2000) Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* **290**, 1166–1168.
- Morrow, E. H. & Gage, M. J. G. (2000) The evolution of sperm length in moths. *Proceedings of the Royal Society B* **267**, 307-313.
- Mostafalou, S. & Abdollahi, M. (2013) Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology* **268**, 157–177. doi:10.1016/j.taap.2013.01.025
- Nadolski, J. (2012) Structure of Nests and Colony Sizes of the European Hornet (*Vespa crabro*) and Saxon wasp (*Dolichovespula saxonica*) (Hymenoptera: Vespinae) in Urban Conditions. *Sociobiology* **59**, 1075-1120.
- Nakamura, M. & Sonthichai, S. (2004) Nesting habits of some hornet species (Hymenoptera, Vespidae) in Northern Thailand. *Kasetsart Journal. Natural Science* **38**, 196–206.
- Naug, D., Camazine, S. (2002). The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *Journal of Theoretical Biology*, 215, 427–439. doi:10.1006/jtbi.2001.2524
- Nicolis, S.C. & Deneubourg, J.L. (1999) Emerging Patterns and Food Recruitment in Ants: an Analytical Study. *Journal of Theoretical Biology* **198**, 575–592. doi:10.1006/jtbi.1999.0934
- Nixon, H.L. & Ribbands, C.R. (1952) Food transmission within the honeybee community. *Proceedings of the royal society B* **140**, 43-50; DOI: 10.1098/rspb.1952.0042.

Références

- Nguyen, T. M., Bressac, C. & Chevrier, C. (2013) Heat stress affects male reproduction in a parasitoid wasp. *Journal of insect Physiology* **59**, 248–254.
- Ochocki, B.M. & Miller, T.E.X. (2017) Rapid evolution of dispersal ability makes biological invasions faster and more variable. *Nature Communications* **8**, 14315. doi:10.1038/ncomms14315
- O'Donnell, S. & Jeanne, R.L. (1990) Forager specialization and the control of nest repair in *Polybia occidentalis* Oliver (Hymenoptera; Vespidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **27**, 359–364.
- O'donnell, S. & Jeanne, R.L. (1992) Lifelong patterns of forager behavior in a tropical swarm-founding wasps: effects of specialization and activity level on longevity. *Anim. Behav.* **44**, 1021–1027.
- O'Donnell, S. & Jeanne, R.L. (1995) The roles of body size and dominance in division of labor among workers of the eusocial wasp *Polybia occidentalis* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **68**, 43–50.
- O'donnell, S. (1999) The function of male dominance in the eusocial wasp *Mischocyttarus mastigophorus* (Hymenoptera: Vespidae). *Ethology* **105**, 273–282.
- Ohashi, K., D'Souza, D. & Thomson, J.D. (2010) An automated system for tracking and identifying individual nectar foragers at multiple feeders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**, 891–897. doi:10.1007/s00265-010-0907-2
- Oldroyd, B.P. (2007) What's killing American honey bees? *PLoS biology* **5**, 1195–1199. doi:10.1371/journal.pbio.0050168
- Orians, G.H. & Pearson, N.E. (1979) On the theory of central place foraging. In D.J. Horn, G.R. Stairs and R.D. Mitchell (Eds.) *Analysis of ecological systems*, Columbus: Ohio State University Press. pp. 155–77.
- Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N.O. (2013) Action on the Surface: Entomopathogenic fungi versus Insect Cuticle. *Insects*, 4:357–374. DOI: 10.3390/insects4030357
- Page, R.E. Jr. (1986). Sperm utilization in social insects. *Annual Review of Entomology* **31**, 297– 320.
- Osborne, J.L., Clark, S.J., Morris, R.J., Williams, I.H., Riley, J.R., Smith, A.D., Reynolds, D.R. & Edwards A.S (1999) A landscape-scale study of bumble bee foraging range and constancy, using harmonic radar. *Journal of Applied Ecology* **36**, 519–533.
- Osborne, J.L., Loxdale, H.D. & Woiwod, I.P. (2002) Chapter 2 : Monitoring insect dispersal: methods and approaches. In “Dispersal ecology”, 42nd Symposium of the British Ecological Society. Pp24–42.
- Osborne, J.L., Martin, A.P., Carreck, N.L., Swain, J.L., Knight, M.E., Goulson, D., Hale, R.J. & Sanderson, R.A. (2008) Bumblebee flight distances in relation to the forage landscape. *Journal of Animal Ecology* **77**, 406–415. doi:10.1111/j.1365-2656.2007.01333.x.

Références

- Oster, G.F. & Wilson, E.O. (1978). Caste and ecology in the social insects. Princeton University Press, New Jersey. Pp26-71.
- Overmyer, S.L. & Jeanne, R.L. (2000) Behavioral evidence for a food site marking substance in the German yellowjacket. *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae). *J Insect Behav*
- Pacala, S.W., Gordon, D.M. & Godfray, H.C.J. (1996). Effects of social group size on information transfer and task allocation. *Evolutionary Ecology*, 10, 127–165.
- Page, R.E. (1986) Sperm utilization in social insects. *Annual Review of Entomology* **31**, 297-320.
- Page, R.E. & Metcalf, R.A. (1982) Multiple mating, sperm utilization, and social evolution. *The American Naturalist* **119**, 263-281.
- Pahl, M., Zhu, H., Tautz, J. & Zhang, S. (2011) Large scale homing in honeybees. *PLoS ONE* **6**, e19669. doi:10.1371/journal.pone.0019669
- Paillot, A. (1917) Observations et experiences sur les champignons parasites des insectes. *Annales des Epiphyties* **7**, 329-334.
- Palmer, K. A. & Oldroyd, B. P. (2000) Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie* **31**, 235-248.
- Pamilo, P. (1985) Effect of inbreeding on genetic relatedness. *Hereditas* **103**, 195-200.
- Pamilo, P. (1991) Evolution of colony characteristics in social insects. II. Number of reproductive individuals. *The American Naturalist* **138**, 412-433.
- Pankiw, T. (2004) Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision-making. *Apidologie* **35**, 217–226. doi:10.1051/apido:2004009
- Parker, B.L., Skinner, M., Gouli, S.Y., Gouli, V.V., Tobi, D. & Kim, J.S. (2015) Persistence of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato in Vermont (USA) forest soil. *Biocontrol Science and Technology* **25**, 768-788. doi: 10.1080/09583157.2015.1016895
- Parrish MD, Fowler HG (1983) Contrasting foraging-related behaviours in two sympatric wasps (*Vespula maculidfrons* and *V. germanica*). *Ecol. Entomol.* **8**, 185-190.
- Peat, J., Darvill, B., Ellis, J. & Goulson, D. (2005) Effects of climate on intra-and interspecific size variation in bumble-bees. *Functional Ecology* **19**, 145–151.
- Peig, J. & Green, A.J. (2009) New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* **118**, 1883–1891.
- Perrard, A., Haxaire, J., Rortais, A. & Villemant, C. (2009) Observations on the colony activity of the Asian hornet *Vespa velutina* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae) in France. *Annales de la Société entomologique de France* **45**, 119–127. doi:10.1080/00379271.2009.10697595.
- Perrard, A. (2012) Systématique et morphométrie géométrique : l'évolution de la nervation alaire au sein du genre *Vespa* (Hyménoptères : Vespidés). PhD Thesis report pp 32-42.

Références

- Perrard, A., Villemant, C., Carpenter & J.M. & Baylac, M. (2012) Differences in caste dimorphism among three hornet species (Hymenoptera: Vespidae): forewing size, shape and allometry: Caste dimorphism in hornets. *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 1389–1398. doi:10.1111/j.1420-9101.2012.02527.x
- Perrard, A., Arca, M., Rome, Q., Muller, F., Tan, J., Bista, S., Nugroho, H., Baudoin, R., Baylac, M., Silvain, J.-F., Carpenter, J.M. & Villemant, C. (2014) Geographic variation of melanisation patterns in a hornet species: Genetic differences, climatic pressures or aposematic constraints? *PLoS ONE* **9**, e94162. doi:10.1371/journal.pone.0094162
- Pershad, S. (1967) Analyse de différents facteurs conditionnant les échanges alimentaires dans une colonie d'abeilles *Apis mellifica* L. au moyen du radio isotope P32. *Les Annales de l'Abeille* **10**, pp.139-197. <hal-00890256>
- Perveen, F. & Shah, M. (2013) Nest architectural patterns by three wasp Species (*Vespa velutina*, *Polistes flavus* and *Sceliphron formosum*) with reference to their behavior. *International Journal of Insect Science* **1**. doi:10.4137/IJIS.S10737
- Phillips, B.L., Brown, G.P., Travis, J.M.J. & Shine, R. (2008) Reid's paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. *Am. Nat.* **172**, S34–S48.
- Plotkin, M., Hod, I., Zaban, A., Boden, S.A., Bagnall, D.M., Galushko, D. & Bergman, D.J. (2010) Solar energy harvesting in the epicuticle of the oriental hornet (*Vespa orientalis*). *Naturwissenschaften* **97**, 1067–1076. doi:10.1007/s00114-010-0728-1.
- Plowright, R.C. & Pallet, M.J. (1979) Worker-male conflict and inbreeding in bumble bees (Hymenoptera, Apidae). *Canadian Entomologist* **111**, 289-294.
- Poidatz, J., Bressac, C., Bonnard, O. & Thiéry, D. (2017) Delayed sexual maturity in males of *Vespa velutina*. *Insect Science*, DOI: 10.1111/1744-7917.12452.
- Porporato, M., Manino, A., Laurino, D. & Demichelis, S. (2014) *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera Vespidae): A first assessment two years after its arrival in Italy. *Redia* **97**, 189–194.
- Portha, S., Deneubourg, J.-L. & Detrain, C. (2002) Self-organized asymmetries in ant foraging: a functional response to food type and colony needs. *Behav. Ecol.* **13**, 776–781. doi:10.1093/beheco/13.6.776
- Potter, N.B. (1964) A study of the biology of the common wasp, *Vespula vulgaris* L., with special reference to the foraging behaviour. Thesis, University of Bristol.
- Potrich, M., Alves, L.F.A., Haas, J., Silva, E.R.L. da, Daros, A., Pietrowski, V. & Neves, P.M.O.J. (2009) Selectivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotropical Entomology* **38**, 822–826. doi:10.1590/S1519-566X2009000600016
- Prasifka, J. R., Heinz, K. M. & Sansone, C. G. (2001). Field testing rubidium marking for quantifying intercrop movement of predatory arthropods. *Environmental Entomology* **30**, 711–19.

Références

- Pyke, G.H., Pulliam, H.R. & Charnov, E.L. (1977) Optimal foraging: a selective review of theory and tests. *The Quarterly Review of Biology* **52**, 137-154.
- Pyke, G.H. (1984) Optimal foraging: a critical review. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**, 523–575.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J.A., Maranhao, E.A., Ortiz-Urquiza, A. & Santiago-Álvarez, C. (2007) Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soil. *Mycological research* **111**, 947-966.
- Quimio, G.M. & Walter, G.H. (2000) Swarming, delayed sexual maturation of males, and mating behavior of *Fopius arisanus* (Sonan)(Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behavior* **13**, 797–813.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Fernandes, E.K.K., Keyser, C.A., Hallsworth, J.E. & Roberts, D.W. (2015) Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during colonial formation. *Current Genetics*. DOI: 10.1007/s00294-015-0477-y
- Ratnieks, F.L.W. & Visscher, P.K. (1989) Worker policing in the honeybee. *Nature* **342**, 796 – 797. doi:10.1038/342796a0
- Ratnieks, F.L. & Keller, L. (1998) Queen control of egg fertilization in the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **44**, 57–61.
- Ray, D.E. & Richards, P.G. (2001) The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Letters* **120**, 343–351. doi:10.1016/S0378-4274(01)00266-1
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. Accessed 17/08/2017.
- Reeve, H.K. (1991) Polistes. In: The Social Biology of Wasps (Ross K.G. and Matthews R.W., Eds). Comstock Publ. Assoc., New York, pp. 99-148
- Reeve, H.K. & Nonacs, P. (1992) Social contracts in wasp societies. *Nature* **359**, 823-825.
- Rehner, S.A. (2005) Phylogenetics of the genus *Beauveria*. In “Insect-Fungal associations: Ecology and Evolution”. Ed Fernando E. Vega & Meredith Blackwell, Oxford University Press, pp 3-27.
- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.-H., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L. & Humber, R.A. (2011) Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* **103**, 1055–1073. doi:10.3852/10-302
- Reynolds, D.R. & Riley, J.R. (2002) Remote-sensing, telemetric and computer-based technologies for investigating insect movement: a survey of existing and potential techniques. *Computers and Electronics in Agriculture* **35**, 271–307.

Références

- Reynolds, A.M., Smith, A.D., Menzel, R., Greggers, U., Reynolds, D.R. & Riley, J.R. (2007) Displaced honey bees perform optimal scale free search flights. *Ecology* **88**, 1955–1961. doi:10.1890/06-1916.1
- Richards, O. W. (1978) The Social Wasps of the Americas Excluding the Vespinae. British Museum (Natural History), London, England. 580 pp.
- Raveret Richter, M. & Jeanne, R.L. (1991) Hunting behaviour, prey capture and ant avoidance in the tropical social wasp *Polybia sevicea* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes sociaux* **38**, 139–147.
- Raveret Richter, M. & Tisch, V.L. (1999) Resource choice of social wasps : influence of presence, size and species of resident wasps. *Insectes Sociaux* **46**, 131–136.
- Raveret Richter, M. (2000) Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. *Annual review of entomology* **45**, 121–150.
- Riley, J.R., Smith, A.D., Reynolds, D.R., Edwards, A.S., Osborne, J.L., Williams, I.H., Carreck, N.L. & Poppy, G.M. (1996) Tracking bees with harmonic radar. *Nature* **379**, 29–30.
- Reynolds, D.R. & Riley, J.R. (2002) Remote-sensing, telemetric and computer-based technologies for investigating insect movement: a survey of existing and potential techniques. *Computers and Electronics in Agriculture* **35**, 271–307.
- Reynolds, A.M., Smith, A.D., Reynolds, D.R., Carreck, N.L., Osborne, J.L. (2007) Honeybees perform optimal scale-free searching flights when attempting to locate a food source. *Journal of Experimental Biology* **210**, 3763–3770. doi:10.1242/jeb.009563
- Robinet, C., Suppo, C. & Darrouzet, E. (2016) Rapid spread of the invasive yellow-legged hornet in France: the role of human-mediated dispersal and the effects of control measures. *Journal of Applied Ecology* **54**, 205–215.
- Rocha, S.L., Evans, H.C., Jorge, V.L., Cardoso, L.A.O., Pereira, F.S.T., Rocha, F.B., Barreto, R.W., Hart, A.G. & Elliot, S.L. (2017) Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. *Royal Society Open Science* **4**, 160628. doi:10.1098/rsos.160628
- da Rocha, A.A. & Giannotti, E. (2007) Foraging activity of *Protopolybia exigua* (Hymenoptera, Vespidae) in different phases of the colony cycle, at an area in the region of the Médio São Francisco River, Bahia, Brazil. *Sociobiology* **50**, 813–831.
- Rodet, G. & Henry, M. (2014) Analytic partitioning of honeybee (*Apis mellifera* L.) flight activity at nest entrance: adaptation and behavioural inertia in a changing environment. *Ecological Research* **29**, 1043–1051. DOI : 10.1007/s11284-014-1191-9
- Rojik, I., Nemcsók, J. & Boross, L. (1983) Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. *Acta Biologica Hungarica* **34**, 81–92.
- Roland, G. (1976) Approche eco-ethologique et biologique des Societes de *Paravespula vulgaris* et *germanica*. *These de Docteur Es-Sciences Naturelles. Univ. de Nancy*, pp. 1–309.

Références

- Rome, Q., Perrard, A., Muller, F. & Villemant, C. (2011) Monitoring and control modalities of a honeybee predator, the yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae). *Aliens* **31**, 7–15.
- Rome, Q., Dambrine, L., Onate, C., Muller, F., Villemant, C., García Pérez, A.L., Maia, M., Carvalho Esteves, P. & Bruneau, E. (2013) Spread of the invasive hornet *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, in Europe in 2012 (Hym., Vespidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France* **118**, 21–22.
- Rome, Q., Muller, F.J., Touret-Alby, A., Darrouzet, E., Perrard, A. & Villemant, C. (2015) Caste differentiation and seasonal changes in *Vespa velutina* (Hym.: Vespidae) colonies in its introduced range. *Journal of Applied Entomology* **139**, 771–782. doi:10.1111/jen.12210
- Roosen-Runge, E. C. (1977) The process of spermatogenesis in animals. Cambridge University Press, Cambridge, 102-132.
- Rortais, A., Villemant, C., Olivier, G., Rome, Q., Haxaire, J., Papachristoforou, A. & Arnold, G. (2010) A New Enemy of Honeybees in Europe: the Asian Hornet *Vespa velutina*. In: Settele, J., (Ed.), Atlas of Biodiversity Risks - from Europe to the Globe, From Stories to Maps. Pensoft, Sofia, Moscow.
- Rose, E.A.F., Harris, R.J. & Glare, T.R. (1999) Possible pathogens of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) and their potential as biological control agents. *New Zealand Journal Zoology* **26**, 179–190.
- Ross, K.G. (1985). Aspects of worker reproduction in four social wasp species (Insecta: Hymenoptera: Vespidae). *Journal of Zoology* **205**, 411–424.
- Ross, K.G. & Fletcher, D.J. (1986) Diploid male production—a significant colony mortality factor in the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **19**, 283–291.
- Rossoni, C., Kassab, S.O., Loureiro, E.D.S., Pereira, F.F., Costa, D.P., Barbosa, R.H. & Zanuncio, J.C., (2014) *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Florida Entomologist* **97**, 1794–1804. doi:10.1653/024.097.0455.
- Rolff, J. (2001) Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Canadian Journal of Zoology* **79**, 2176–2180. doi:10.1139/cjz-79-12-2176.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O'Neil, P., Parker, I.M., Thompson, J.N. & Weller, S.G. (2001) The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 305-332.
- Salamova, A., Pagano, J.J., Holsen, T.M. & Hites, R.A. (2013) Post-1990 temporal trends of PCBs and organochlorine pesticides in the atmosphere and in fish from lakes Erie, Michigan, and Superior. *Environmental Science & Technology* **47**, 9109–9114. doi:10.1021/es401895g.

Références

- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T. & Christou, P. (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 283–300. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x.
- Schlüns, H., Schlüns, E., Van Praagh, J. & Moritz, R. (2003) Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie* **34**, 577–584.
- Schmid-Hempel, P., Kacelnik, A., Houston, A.I. (1985) Honeybees maximize efficiency by not filling their crop. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **17**, 61–66.
- Schmid-Hempel, P. & Crozier, R.H. (1999) Ployandry versus polygyny versus parasites. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 507–515. doi: 10.1098/rstb.1999.0401.
- Schmitz, V., Rochrich, R. & Stockel, J. (1995) Etude du mécanisme de la confusion sexuelle pour l'Eudémis de la vigne *Lobesia botrana* Den. Et Schiff. (Lep., Tortricidae). I. Rôles respectifs de la compétition, du camouflage de la piste odorante et de la modification du signal phéromonal. *Journal of Applied Entomology* **119**, 131–138.
- Schneider, C.W., Tautz, J., Grünewald, B. & Fuchs, S. (2012) RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**, e30023. doi:10.1371/journal.pone.0030023.
- Schöne, H., Harris, A.C., Mahalski, P. (1993a) Homing after displacement in open or closed containers by the diggerwasp *Argogorytes carbonarius* (Hymenoptera: Sphecidae). *Ethology* **95**, 152–156.
- Schöne, H., Tengö, J., Kühme, D. & Kühme, L. (1993b) Homing with or without sight of surroundings and sky during displacement in the digger wasp *Bembix rostrata* (Hymenoptera: Sphecidae). *Ethology Ecology and Evolution* **5**, 549–552.
- Shah, F.A. & Shah, T.A. (1991) *Vespa velutina*, a serious pest of honey bees in Kashmir. *Bee World* **72**, 161–164.
- Shahid, A., Rao, Q., Bakhsh, A. & Husnain, T. (2012) Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences* **64**, 21–42. doi:10.2298/ABS1201021S.
- Shaw, F.R. & Weidhaas, J. (1956) Distribution and habits of the giant hornet in North America. *J Econ. Entomol.* **49**, 275–275. doi:10.1093/jee/49.2.275
- Silcox, D.E., Daskocil, J.P., Sorenson, C.E. & Brandenburg, R.L. (2011) Radio frequency identification tagging: a novel approach to monitoring surface and subterranean insects. *American Entomologist* **57**, 86–93.
- Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D.A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E. & Vilà, M. (2013) Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution* **28**, 58–66. doi:10.1016/j.tree.2012.07.013.

Références

- Simmons, L.W. & Siva-Jothy, M.T. (1998) Sperm competition in insects: Mechanisms and the potential for selection, in: Birkhead T.R., Moller A.P., Sperm Competition and sexual selection, Academic press, pp341-414.
- Simões, D. (1977) Etologia e diferenciação de casta em algumas vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae). PhD thesis. Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo.
- Snyder, W.E. & Evans E.V. (2006) Ecological effects of invasive arthropod generalist predators. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **37**, 95-122.
- Smith, R.J. & Grula, E.A. (1982) Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* **39**, 15-22.
- Snook, R. (2005) Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 46-53. doi:10.1016/j.tree.2004.10.011.
- Southwick, E.E. & Buchmann, S.L. (1995) Effects of horizon landmarks on homing success in honeybees. *American Naturalist* **146**, 748-764.
- Snodgrass, R.E. (1956) Anatomy of the honeybee. Ithaca, New York, Comstock Publ. Ass.
- Spiewok, S. & Schmolz, E. (2005) Changes in temperature and light alter the flight speed of hornets (*Vespa crabro* L.). *Physiological and Biochemical Zoology* **79**, 188-193.
- Spiewok, S., Schmolz, E. & Ruther, J. (2006) Mating system of the european hornet *Vespa crabro*: Male seeking strategies and evidence for the involvement of a sex pheromone. *Journal of Chemical Ecology* **32**, 2777-2788.
- Spradbery, J.P. (1973) Wasps: an account of the biology and natural history of social and solitary wasps. University of Washington Press, Seattle.
- Starnes, R.L., Liu, C.L. & Marrone, P.G. (1993) History, use, and future of microbial insecticides. *American Entomologist* **39**, 83-91.
- Steffan-Dewenter, I. & Kuhn, A. (2003) Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 569-575. doi:10.1098/rspb.2002.2292.
- Stein, K. J. & Fell, R.D. (1994) Correlation of Queen Sperm Content with Colony Size in Yellowjackets (Hymenoptera: Vespidae). *Environmental Entomology* **23**, 1497-1500.
- Stein, K. J., Fell, R.D. & Holtzman, G.I. (1996) Sperm use dynamics of the Baldfaced hornet (Hymenoptera: Vespidae). *Environmental Entomology* **25**, 1365-1370.
- Stelzer, R.J. & Chittka, L. (2010). Bumblebee foraging rhythms under the midnight sun measured with radiofrequency identification. *BMC biology* **8**, 1.
- Stelzer, R.J., Chittka, L., Carlton, M. & Ings, T.C. (2010) Winter active bumblebees (*Bombus terrestris*) achieve high foraging rates in urban britain. *PLoS ONE* **5**, e9559. doi:10.1371/journal.pone.0009559.

Références

- Stimmann, M. W. (1974). Marking Insects with Rubidium: Imported Cabbageworm Marked in the Field. *Environmental Entomology* **3**, 327–28.
- St Leger, R.J., Durrands, A.K., Charnley, A.K. & Cooper, R.M. (1988a) Role of extracellular Chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of invertebrate pathology* **52**, 285-293.
- St Leger, R.J., Cooper, R.M. & Charnley, A.K. (1988b). The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **52**, 459–470.
- St leger, R., Butt, T.M., Goettel, M.S., Staples, R.C. & Roberts, D.W. (1989) Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* **13**, 274–288.
- St. Leger, R. (1993). Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. In: Parasites and pathogens of insects. Vol. 2, Pathogens. N. E. Beckage and B. Federici (eds.). Academic Press, New York, pp. 211-230.
- St. Leger, R. J. & Joshi, L. (1997) The application of molecular techniques to insect pathology with empahsis on entomopathogenic fungi. In “Manual of Techniques in Insect Pathology” (L. A. Lacey, Ed.). pp. 367–394. Academic Press, London.
- Stow, A. & Beattie, A. (2008) Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. *Brain, behavior, and immunity* **22**, 1009–1013. doi:10.1016/j.bbi.2008.03.008
- Strassman, J.E. (1979) Honey caches help female paper wasps (*Polistes annularis*) survive Texas winters. *Science* **204**, 207–209. doi:10.1126/science.204.4389.207.
- Strassmann, J.E. & Meyer, D.C. (1983) Gerontocracy in the social wasp, *Polistes exclamans*. *Animal Behavior* **31**, 431-438.
- Strassmann, J.E. (2001) The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux* **48**, 1–13.
- Strohm, E. (2000). Factors affecting body size and fat content in a digger wasp. *Oecologia* **123**, 184–191.
- Stürzl, W., Zeil, J., Boeddeker, N. & Hemmi, J.M. (2016) How wasps acquire and use views for homing. *Current Biology* **26**, 470-482.
- Suarez, A.V., Tsutsui, N.D., Holway, D.A. & Case, T.J. (1999) Behavioral and genetic differentiation between native and introduced populations of the Argentine ant. *Biological Invasions* **1**: 43–53.
- Suchail, S., Guez, D. & Belzunces, L.P. (2001) Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 2482–2486. doi:10.1002/etc.5620201113.

Références

- Sumner, S., Lucas, E., Barker, J. & Isaac, N. (2007) Radio-tagging technology reveals extreme nest-drifting behavior in a eusocial insect. *Current Biology* **17**, 140–145. doi:10.1016/j.cub.2006.11.064.
- Suty L. (2010). « La lutte biologique, définitions et concepts généraux » in « La lutte biologique, vers de nouveaux équilibres écologiques ». Ed. Quae, pp44-62.
- Takagi, M., Hirose, Y. & Yamasaki, M. (1980) Prey-location learning in *Polistes jadwigae* DALLA TORRE (Hymenoptera, Vespidae), Field experiments on orientation. *Kontyû, Tokyo* **48**, 53–58.
- Takahashi, J., Akimoto, S., Hasegawa, E. & Nakamura, J. (2002) Queen mating frequencies and genetic relatedness between workers in the hornet *Vespa ducalis* (Hymenoptera: Vespidae). *Applied Entomology and Zoology* **37**, 481–486.
- Takahashi, J., Akimoto, S., Martin, S. J., Tamukae, M. & Hasegawa, E. (2004) Mating structure and male production in the giant hornet *Vespa mandarinia* (Hymenoptera: Vespidae). *Applied Entomology and Zoology* **39**, 343–349.
- Takashi, A., Yoshiya, T., Hiromitsu, M., Miyazaki, H. & Kawasaki, Y.Y (1991) Comparative study of the composition of hornet larval saliva, its effect on behaviour and role of trophallaxis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **99**, 79–84.
- Tao, S., Xu, F.L., Wang, X.J., Liu, W.X., Gong, Z.M., Fang, J.Y., Zhu, L.Z. & Luo, Y.M. (2005) Organochlorine pesticides in agricultural soil and vegetables from Tianjin, China. *Environmental Science & Technology* **39**, 2494–2499. doi:10.1021/es048885s
- Tan, K., Radloff, S.E., Li, J.J., Hepburn, H.R., Yang, M.X., Zhang, L.J. & Neumann, P. (2007) Bee-hawking by the wasp, *Vespa velutina*, on the honeybees *Apis cerana* and *A. mellifera*. *Naturwissenschaften* **94**, 469–472. doi:10.1007/s00114-006-0210-2
- Tan, K., Wang, Z., Li, H., Yang, S., Hu, Z., Kastberger, G. & Oldroyd, B.P. (2012) An “I see you” prey–predator signal between the Asian honeybee, *Apis cerana*, and the hornet, *Vespa velutina*. *Animal Behaviour* **83**, 879–882. doi:10.1016/j.anbehav.2011.12.031
- Tao, S., Liu, W.X., Li, X.Q., Zhou, D.X., Li, X., Yang, Y.F., Yue, D.P. & Coveney, R.M. (2009) Organochlorine pesticide residuals in chickens and eggs at a poultry farm in Beijing, China. *Environmental Pollution* **157**, 497–502. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.005
- Tarpy, D. R., Nielsen R. & Nielsen D.I. (2004) A scientific note on the revised estimates of paternity frequency in *Apis*. *Insectes Sociaux* **51**, 203–204
- Tenczar, P., Lutz, C.C., Rao, V.D., Goldenfeld, N. & Robinson, G.E. (2014) Automated monitoring reveals extreme interindividual variation and plasticity in honeybee foraging activity levels. *Animal Behaviour* **95**, 41–48. doi:10.1016/j.anbehav.2014.06.006
- Theralauz, G., Bonabeau, E. & Deneubourg, J.L. (1998). The origin of nest complexity in social insects. *Complexity* **3**, 15–25.
- Therneau, T. (2014) A Package for Survival Analysis in S. R package version 2.37-7.

Références

- Thompson, S.R., Brandenburg, R.L. & Arends, J.J. (2006) Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. *Biological Control* **39**, 401-407.
- Thorpe, W.H. (1963) Learning and instinct in animals. Harvard University Press, Cambridge.
- Tiegs, O.W. (1955) The flight muscles of insects-Their anatomy and histology; with some observations on the structure of striated muscle in general. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **238**, 221-348.
- Thiel, A. & Weeda, A.C. (2014) Haploid, Diploid, and Triploid--Discrimination ability against polyploid mating partner in the parasitic wasp, *Bracon brevicornis* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Science* **14**, 291-291. doi:10.1093/jisesa/ieu153
- Toft, R.J. & Rees, J.S. (1998) Reducing predation of orb-web spiders by controlling common wasps (*Vespula vulgaris*) in a New Zealand beech forest. *Ecol Entomol* **23**, 90-95
- Toh, Y. & Okamura, J. (2003) Foraging navigation of hornets studied in natural habitats and laboratory experiments. *Zoological Science* **20**, 311-324. doi:10.2108/zsj.20.311.
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D. & Kuris, A.M. (2002) Parasites and marine invasions. *Parasitology* **124**. doi:10.1017/S0031182002001506
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D., Dobson, A.P., McKenzie, V.J. & Kuris, A.M. (2003) Introduced species and their missing parasites. *Nature* **421**, 628-630.
- Toth, A.L. (2005). Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *Journal of Experimental Biology* **208**, 4641-4649. doi:10.1242/jeb.01956
- Tragust, S., Ugelvig, L.V., Chapuisat, M., Heinze, J. & Cremer, S. (2013) Pupal cocoons affect sanitary brood care and limit fungal infections in ant colonies. *BMC evolutionary biology* **13**, 1.
- Travis, J.M.J. & Dytham, C. (2002) Dispersal evolution during invasions. *Evol. Ecol. Res.* **4**, 1119-1129.
- Tuininga, A., Miller, J., Morath, S., Daniels, T., Falco, R., Machese, M., Sahabi, S., Rosa, D. & Stafford, K. (2009) Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: Prevalence and methods. *J. Med. Entomol.* **46**, 557-565.
- Ueno, T. (2015) Establishment of the invasive hornet *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae) in Japan. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences* **2**, 2320-4087.
- Ugelvig, L.V. & Cremer, S. (2007) Social Prophylaxis: Group interaction promotes collective immunity in ant colonies. *Current Biology* **17**, 1967-1971. doi:10.1016/j.cub.2007.10.029
- Ugolini, A. (1985) Initial orientation and homing in workers of *Polistes gallicus* (L.) (Hymenoptera, Vespidae). *Zeitschrift fur Tierpsychologie* **69**, 133-140.
- Ugolini, A. (1986) Homing ability in *Polistes gallicus* (L.) (Hymenoptera Vespidae). *Monitore Italian Journal of Zoology* **20**, 1-15.

Références

- Ugolini, A. (1987) Visual information acquired during displacement and initial orientation in *Polistes gallicus* (L.)(Hymenoptera, Vespidae). *Animal Behaviour* **35**, 590-595.
- Ugolini, A., Kessler, A. & Ishay, J.S. (1987) Initial orientation and homing by oriental hornets, *Vespa orientalis* L. (Hymenoptera, Vespidae). *Monitore Zoologico Italiano* **21**, 157-164.
- Van der Velde G., Rajagopal S., Kuyper-Kollenaar M., Bij de Vaate A., Thieltges D. and MacIsaac H. (2006). Biological invasions: concepts to understand and predict a global threat. In: Wetlands: functioning, biodiversity conservation, and restoration. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag: 61-90.
- Van Geystelen, A., Benaets, K., de Graaf, D.C., Larmuseau, M.H.D. & Wenseleers, T. (2016) Track-a-Forager: a program for the automated analysis of RFID tracking data to reconstruct foraging behaviour. *Insectes Sociaux* **63**, 175–183. doi:10.1007/s00040-015-0453-z.
- Van Nieuwstadt, M.G.L. & Ruano Iraheta, C.E. (1996) Relation between size and foraging range in stingless bees (Apidae, Meliponinae). *Apidologie* **27**, 219–228.
- van Valen, L. (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* **1**, 1-30.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzón, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., Rangel, D.E.N. & Roy, H.E. (2009) Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* **2**, 149–159. doi:10.1016/j.funeco.2009.05.001
- Velthuis, H.W., Koedam, D. & Imperatriz-Fonseca, V. (2005) The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie* **36**, 169-185.
- Vey, A., Fargues, J. & Robert, P. (1982) Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarhizium anisopliae* for scarabeid larvae. *Entomophaga* **27**, 387-397.
- Villemant, C., Barbet-Massin, M., Perrard, A., Muller, F., Gargominy, O., Jiguet, F. & Rome, Q. (2011) Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. *Biological Conservation* **144**, 2142–2150. doi:10.1016/j.biocon.2011.04.009.
- Villemant, C., Zuccon, D., Rome, Q., Muller, F., Poinar Jr, G. O. & Justine, J. L. (2015) Can parasites halt the invader? Mermithid nematodes parasitizing the yellow-legged Asian hornet in France. *PeerJ* **3**:e947, DOI 10.7717/peerj.947
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J. & Melillo, J.M. (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science* **277**, 494-499.
- Vogl, J. & Heumann, K.G. (1997) Determination of heavy metal complexes with humic substances by HPLC/ICP-MS coupling using on-line isotope dilution technique. *Fresenius' journal of analytical chemistry* **359**, 438–441.

Références

- Volynchik, S., Plotkin, M., Bergman, D.J. & Ishay, J.S. (2008) Hornet flight activity and its correlation with UVB radiation, temperature and relative humidity. *Photochememistry and Photobiology* **84**, 81–85.
- Warton, D.I., Duursma, R.A., Falster, D.S. & Taskinen, S. (2012) smatr 3 - an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution* **3**, 257-259.
- Watson, P.F. & Martin, I.C.A. (1974) Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm. *Nature* **251**, 315 – 316.
- Wedell, N., Gage, M. J. G. & Parker, G. A. (2002) Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology and evolution* **17**, 313-320.
- Weis, J. (2010). The role of behavior in the success of invasive crustaceans. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **43**, 83-98.
- Weiss, B. (1997) Pesticides as a source of developmental disabilities. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* **3**, 246-256.
- Weissel, N., Mitesser, O., Poethke, H.-J. & Strohm, E. (2012). Availability and depletion of fat reserves in halictid foundress queens with a focus on solitary nest founding. *Insectes Sociaux* **59**, 67–74. doi:10.1007/s00040-011-0189-3
- Weiss-Lehman, C., Hufbauer, R.A. & Melbourne, B.A. (2017) Rapid trait evolution drives increased speed and variance in experimental range expansions. *Nature Communications* **8**, 14303. doi:10.1038/ncomms14303
- Wehner, R. & Menzel, R. (1990) Do insects have cognitive maps? *Annual Reviews of Neuroscience* **13**, 403-414.
- Wen, P., Cheng, Y.-N., Dong, S.-H., Wang, Z.-W., Tan, K. & Nieh, J.C. (2017) The sex pheromone of a globally invasive honey bee predator, the Asian eusocial hornet, *Vespa velutina*. *Scientific Reports* **7**. doi:10.1038/s41598-017-13509-7
- Wenzel, W. (1987) *Ropalidia formosa*, a Nearly Solitary Paper Wasp from Madagascar (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **60**, 549-556.
- West-Eberhard, M.J. (1969) The social biology of polistine wasps: Non reproductive helpers without altruism? *Science* **200**, 441-443.
- Wheeler, D.E. & Krutzsch, P.H. (1992) Internal reproductive system in adult males of the Genus *camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *Journal of Morphology* **211**, 307–317.
- Whorton, D., Krauss, R., Marshall, S. & Milby, T. (1977) Infertility in male pesticide workers. *The Lancet* **2**, Issue 8051 310, 1259–1261. doi:10.1016/S0140-6736(77)92665-4
- Williams, N.M. & Kremen, C. (2007) Resource distributions among habitats determine solitary bee offspring production in a mosaic landscape. *Ecological Applications* **17**, 910-921.
- Williamson, M. (1996) Biological invasions. Chapman and Hall, London, UK.
- Wilson, D.S. (1975) A theory of group selection. *PNAS* **72**, 143–146.

Références

- Wilson, J.R.U., Ajuonu, O., Center, T.D., Hill, M.P., Julien, M.H., Katagira, F.F., Neuenschwander, P., Njoka, S.W., Ogwang, J., Reeder, R.H. & Van, T. (2007) The decline of water hyacinth on Lake Victoria was due to biological control by *Neochetina* spp. *Aquatic Botany* **87**, 90–93. doi:10.1016/j.aquabot.2006.06.006.
- Witt, R. (2015) Erstfund eines Nestes der Asiatischen Hornisse *Vespa velutina* Lepeletier, 1838 in Deutschland und Details zum Nestbau (Hymenoptera, Vespinae). *Ampulex* **7**, 42–53.
- Wojcik, D.P. (1994). Impact of the red imported fire ant on native ant species in Florida. In Exotic ants biology, impact, and control of introduced species, ed. D. F. Williams. Westview Press, Boulder, CO, pp 269-81.
- Wolf, S. & Moritz, R.F.A. (2008) Foraging distance in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* **39**, 419–427. doi:10.1051/apido:2008020.
- Wolf, S., McMahon, D.P., Lim, K.S., Pull, C.D., Clark, S.J., Paxton, R.J. & Osborne, J.L. (2014) So near and yet so far: harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees. *PLoS ONE* **9**, e103989. doi:10.1371/journal.pone.0103989.
- Wraight, S.P. & Roberts, D.W. (1987) Insect control efforts with fungi. Developments in industrial microbiology. Society for industrial microbiology. General meeting. 43, San Francisco (1986) 1987, vol. 28, pp. 77-87.
- Xu, J.V. & Wang, Q. (2009) Male moths undertake both pre- and in-copulation mate choice based on female age and weight. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63**, 801-808. doi:10.1007/s00265-009-0713-x
- Yamagishi, M., Itô, Y. & Tsubaki, Y. (1992) Sperm competition in the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae): Effects of sperm “longevity” on sperm precedence. *Journal of Insect Behavior* **5**, 599-608.
- Yamane, S. (1976) Morphological and taxonomic studies on vespine larvae, with reference to the phylogeny of the subfamily vespinae (Hymenoptera: vespidae). *Insecta matsumurana. Series entomology. New series* **8**, 1-45.
- Yamane, S. & Makino, S. (1977). Bionomics of *Vespa analis insularis* and *V. mandarinia latilineata* in Hokkaido, northern Japan, with notes on Vespine embryo nests (Hymenoptera: vespidae). *Insecta Matsumurana* **12**, 3–27.
- Zayed, A., Roubik, D.W. & Packer, L. (2004) Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **271**, S9–S12.
- Zeil, J. (1993) Orientation flights of solitary wasps (Cerceris; Sphecidae; Hymenoptera). *Journal of Comparative Physiology A* **172**, 189-20
- Zolan, M.E. & Pukkila, P.J. (1986) Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 195–200. doi:10.1128/MCB.6.1.195



25/09/17
DZ
Bords des Cascades
Sentiers de l'Amirauté
Matoury
Guyenne