Collège Doctoral Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par **l'Université Paul-Valéry Montpellier 3**

Préparée au sein de l'école doctorale

ED60, TERRITOIRES, TEMPS, SOCIÉTÉS ET DÉVELOPPEMENT

Et de l'unité de recherche

CENTRE D'ÉCOLOGIE FONCTIONNELLE ET ÉVOLUTIVE - CEFE

Spécialité : **Biologie des Populations et Écologie**

Présentée par **Julia Centanni**

Le complexe *Tapinoma nigerrimum* : Effets de l'urbanisation sur sa répartition et sur sa structuration génétique. Conséquences des espèces proliférantes du complexe sur la myrmécofaune dans le sud de la France

Soutenue le 14 octobre 2022 devant le jury composé de

Mme Claudie DOUMS, Directrice d'études, EPHE	Rapportrice
M. Mickael HEDDE, Directeur de recherche, INRAE	Rapporteur
Mme Magali DESCHAMPS-COTTIN, Maître de conférences, Aix-Marseille Université	Examinatrice
M. Thibaud DECAËNS, Professeur des Universités, Université de Montpellier	Examinateur
M. Pierre JAY-ROBERT, Professeur des Universités, Université Paul-Valéry Montpellier 3	Directeur
M. Alan VERGNES, Maître de conférences, Université Paul-Valéry Montpellier 3	Co-Directeur

Université Paul Valéry Montpellier 3



Fourmi ouvrière de *Tapinoma* en interaction avec des pucerons *(Y. Juvé)*

Remerciements

Je tiens à remercier l'École doctorale ED60 de m'avoir accordé un financement de doctorat.

Je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont apporté leur contribution à l'élaboration de mon projet de thèse et que j'ai pu rencontrer durant ces années perturbées par une période difficile de pandémie et de restrictions sanitaires liées à la Covid 19.

Thibaud Decaens, Magali Deschamps-Cottin, Claudie Doums et Mickael Hedde, je vous adresse mes vifs remerciements pour avoir bien voulu accepter d'évaluer ce travail en participant à mon jury de thèse.

Un grand merci à mes directeurs de thèse Alan Vergnes & Pierre Jay-Robert de m'avoir donné la chance de construire ce projet et d'intégrer cette super équipe. Merci de m'avoir dirigée tout au long de ma thèse ainsi que pour vos nombreux conseils bienveillants ce qui a été très enrichissant. J'ai beaucoup apprécié la liberté et la qualité de vie au travail au sein de l'équipe.

Merci Bernard Kaufmann pour ton sympathique accueil à Lyon. Je te suis reconnaissante pour ta disponibilité et ton investissement. Ce fût un plaisir de travailler avec toi et de découvrir ta passion pour la myrmécologie et la génétique.

Merci aussi à tes collaboratrices. Merci Adeline Dumet pour ta disponibilité, pour m'avoir guidée dans ces longues manips en labo à Lyon et pour ces moments festifs lors de la fête des lumières, c'était très sympa. Merci également Lara pour ta bienveillance.

Marion Cordonnier merci pour tes précieux conseils concernant tes interventions sur le terrain et ta super organisation qui m'ont beaucoup inspirés.

Rumsais Blatrix merci de m'avoir fait partager ta passion pour les fourmis, merci pour ta disponibilité et tes nombreux conseils lors de nos rencontres et de mes comités, toujours très enrichissants.

Merci Olivier Blight pour ton investissement, tes conseils notamment lors de mes comités de thèse et pour ta participation aux collectes de fourmis.

Je remercie également Jérôme Cortet pour ses avis et recommandations lors de ces comités de thèse.

Merci à Annick Lucas pour son agréable et efficace collaboration, qui s'est souvent rendue disponible pour m'accompagner aux quatre coins de la région, parfois même à vélos dans le cadre de mes longues prospections à la recherche de *Tapinoma*. C'était vraiment super sympa !

Je remercie tout particulièrement ma sympathique team fourmis d'étudiants que j'ai eu la chance de connaître et d'encadrer. Merci pour votre motivation, votre investissement et

patience dans la recherche minutieuse et longue de fourmis qui m'ont été d'une grande contribution dans l'avancement de mon étude : Yannick Juvé, Celia Lecomte, Célian Diblasi, Pierre Louis Duarte, Julien Tchilinguirian, Ambre Mautuit, Corentin Sagnet. Merci Yannick pour tes super photos. C'était un vrai plaisir de travailler avec vous ! Je remercie aussi toutes les personnes qui se sont jointes à notre équipe ponctuellement pour participer aux recherches sur le terrain. Nathan et Marine merci pour votre intérêt porté à mon étude, je regrette ne pas avoir pu donner suite à vos demandes de stage en raison des restrictions sanitaires imposées.

Merci à tous les membres de l'équipe ESA pour les bons moments passés en votre compagnie au cours de ces années, toujours dans l'humour, la bienveillance et la sympathie : Amandine, Agnès, Aurore, Camille, Claire, Constantin, Coralie, Cyril, Fred (ou l'orange sanguine), Jonathan, Juliette, Laurent, Léo, Louise, Marin, Martine, Matthias, Nassera, Nicolas, Pierre-Yves, Quilina, Sandra, Sarah, Séverine, Sylvain, Théo, Valentin, William …

Un grand merci Cyril Bernard pour tes conseils instructifs en cartographie sur le logiciel QGIS ainsi que cette super formation que je recommande vivement !

Merci à la Direction Paysage et Biodiversité de la Ville de Montpellier et notamment à Stéphanie Grosset ainsi qu'à M. Gauffier qui a eu la gentillesse de me faire visiter les serres de Grammont et de me faire découvrir, entre autres, la production de végétaux.

Merci à Laurent Dormont de m'avoir permis de présenter les TD de biologie à l'université Paul Valéry, ce fût vraiment très enrichissant, tout comme les TD d'éthologie, qu'Alan a bien voulu me confier.

Renaud Lebrun merci de m'avoir guidée dans l'utilisation du microtomographe sur la plateforme MRI (Labex CEMEB et NUMEV), ce fût très intéressant.

Merci également à Luc Gomel, Alan Lenoir et Eric Provost pour les échanges très instructifs que nous avons pu avoir sur les *Tapinoma.*

Je finirai par adresser un immense remerciement à tous mes amis proches, à Kilian, ainsi qu'à ma famille qui m'ont toujours apporté leur soutien tout au long de ma thèse et dans mes projets.

A ma mère,

Résumé

L'urbanisation modifie le paysage et le fragmente, créant des opportunités pour l'établissement d'espèces invasives natives ou introduites. Les invasions biologiques sont connues comme étant une des causes principales responsables de la dégradation de la biodiversité et impactent ainsi le fonctionnement des écosystèmes. Parmi les espèces invasives, on peut citer les fourmis qui peuvent affecter les autres espèces et notamment la myrmécofaune. Nous nous intéressons ici au complexe d'espèces de fourmis *Tapinoma nigerrimum.* Une des espèces du complexe occupe des habitats naturels ouverts dans la région méditerranéenne et construit des nids uniques, les autres prospèrent dans les zones urbanisées du sud de l'Europe notamment dans la ville de Montpellier et forment des supercolonies au caractère invasif. Cette ville et ses environs ont été choisis pour notre étude car ils ont la particularité de combiner une urbanisation qui s'est rapidement développée et la présence de ces espèces.

Ainsi, l'objectif de cette thèse était d'étudier l'effet de l'urbanisation sur la répartition et sur la structuration génétique des espèces du complexe dans le sud de la France. Nous avons également analysé les effets de la présence d'une des espèces invasives du complexe*, T. darioi*, sur la myrmécofaune.

L'urbanisation a mis en évidence des réponses distinctes pour deux des espèces du complexe présentes dans la zone d'étude. Tandis que *T. nigerrimum sstr.* est impactée négativement et préfère les zones naturelles*, T. darioi* est favorisée par le milieu urbain jusqu'à un certain seuil. Une structuration génétique est également observée pour ces deux espèces où les facteurs historiques et naturels paraissent avoir plus d'effet que l'urbanisation pour *T. nigerrimum* et où la dispersion de *T. darioi* semble être assurée par les activités humaines, potentiellement, par le transport de plantes ornementales. *Tapinoma darioi* n'a actuellement pas montré d'effet sur les autres fourmis qui semblent pour la majorité partager la même niche.

Mots clefs : urbanisation, invasions biologiques, *Tapinoma nigerrimum, Tapinoma darioi,* Montpellier, structuration génétique

Abstract

Urbanization modifies and fragments the landscape, creating opportunities for native or introduced invasive species' establishment. Biological invasions are known to be one of the main causes responsible for the degradation of biodiversity and thus impact the functioning of ecosystems. Among the invasive species, there are ants that can have an impact on other species, especially the myrmecofauna. We are interested here in the species complex of ants *Tapinoma nigerrimum*. One of the species of the complex occupies open natural habitats in the Mediterranean region and builds single nests, the others thrive in urbanized areas of southern Europe including in the city of Montpellier and form supercolonies with an invasive character. This city and its surroundings were chosen for our study because they have the particularity of combining a rapidly developing urbanization and the presence of these species.

Thus, the objective of this thesis was to study the effect of urbanization on the distribution and on the genetic structuring of the species of the complex in the south of France. We also analyzed the effects of the presence of one of the invasive species of the complex, *T. darioi*, on the myrmecofauna.

The urbanization showed distinct responses for two of the species of the complex present in the study area. While *T. nigerrimum sstr*. is negatively impacted and prefers natural areas, *T. darioi* is favored by the urban environment up to a certain threshold. Genetic structuring has also been observed for these two species where historical and natural factors seem to have more effect than urbanization for *T. nigerrimum* and where the dispersal of *T. darioi* seems to be ensured by human activities, potentially, due to the transport of ornamental plants. *Tapinoma darioi* has not until now shown any effect on other ants which seem to share the same niche for the most part.

Keywords: urbanization, biological invasions, *Tapinoma nigerrimum, Tapinoma darioi,* Montpellier, genetic structuration

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 16

1. CHANGEMENTS GLOBAUX ET CRISE DE LA BIODIVERSITÉ 18
2. L'URBANISATION 20
   2.1. Définition 20
   2.2. Impacts de l'urbanisation 23
   2.3. Effets de l'urbanisation sur la structure génétique 27
3. LES INVASIONS BIOLOGIQUES 28
4. LES FOURMIS 31
   4.1. Généralités 31
   4.2. Les fourmis invasives 32
   4.3. Le cas du complexe Tapinoma nigerrimum 36
5. AIRE D'ÉTUDE : MONTPELLIER ET SES ENVIRONS 41
6. PLAN ET OBJECTIFS DE LA THÈSE 44

CHAPITRE 1 46

EFFET DE L'URBANISATION ET CARTOGRAPHIE DES FOURMIS DU COMPLEXE *TAPINOMA NIGERRIMUM* SUR LE TERRITOIRE DU GRAND MONTPELLIER 46

1. RÉSUMÉ 48
2. HIGH RESOLUTION MAPPING IN SOUTHERN FRANCE REVEALS DISTRIBUTIONS OF SUPERCOLONIAL AND MONODOMOUS SPECIES IN THE *TAPINOMA NIGERRIMUM* COMPLEX (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) ARE RELATED TO SENSITIVITY TO URBANIZATION 60

ABSTRACT 60
INTRODUCTION 61
MATERIALS AND METHODS 62
Study area 62
Biological model 63
Sampling scheme 63
Genetic identification by microsatellites 63
Microsatellite development 64
DNA extraction 64
Genotyping 65
Genetic analyzes 65
Spatial analyses 65
Statistical analyses 66
RESULTS 67
Species occurrences 67
Correlations between variables and study area description 68
Effects of land-cover and land-use on the probability of occurrence for Tapinoma nigerrimum and Tapinoma darioi 68
Interactions between distance to the coast and portion of urban land use: 70
DISCUSSION 71
Species occurrence in the Tapinoma nigerrimum complex 71

Distinct spatial patterns between non-invasive and invasive species *72*
CONCLUSION 73
REFERENCES 74
ANNEXES 79

CHAPITRE 2 84

ÉTUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURATION GÉNÉTIQUE DE TROIS ESPÈCES DE FOURMIS DU GENRE *TAPINOMA* 84

1. RÉSUMÉ 86
2. COMPARED OF GENETIC STRUCTURING PATTERNS OF THREE ANT SPECIES OF THE GENUS *TAPINOMA* CO-OCCURRING IN URBAN LANDSCAPE 96
ABSTRACT 96
1. INTRODUCTION 96
2. MATERIALS AND METHODS 101
2.1. Study area, sampling and molecular methods *101*
2.2. Landscape and population genetics analyses *102*
3. RESULT 104
3.1. Clustering *104*
3.2. Isolation-by-distance, spatial autocorrelation and spatial overlay of genetic clusters in Tapinoma madeirense and T. nigerrimum *108*
3.3. Inbreeding patterns *109*
3.4. The complex situation in Tapinoma darioi *110*
4. DISCUSSION 111
4.1. Inbreeding *111*
4.2. Population structure: clustering, IBD and spatial autocorrelation in Tapinoma madeirense and T. nigerrimum *112*
4.3. Population structure and origins in Tapinoma darioi *113*
CONCLUSION 117
REFERENCES 118
ANNEXES 126

CHAPITRE 3 144

CONSÉQUENCES DE LA PRÉSENCE DES FOURMIS INVASIVES *TAPINOMA DARIOI* SUR LA MYRMÉCOFAUNE DES ESPACES VERTS URBAINS DE MONTPELLIER 144

1. INTRODUCTION 147
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES 150
2.1. Zones d'études *150*
2.2. Plan d'échantillonnage *152*
2.3. Analyses statistiques *153*
3. RÉSULTATS 157
3.1 Description des communautés *157*
3.2 Comparaison des espaces verts urbains étudiés *158*
3.3 Analyse des co-occurrences *160*
3.4. Effet pur de la présence de Tapinoma darioi sur la myrmécofaune *160*

4. Discussion 162
Description de la myrmécofaune 162
Effet de la présence de Tapinoma darioi sur la myrmécofaune 163
Analyse des traits des fourmis 164
Propriétés des espaces verts urbains étudiés et biais de l'étude 167
Conclusion 167

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 170

1. Synthèse des résultats 172
2. Discussion 174
Axe 1 : Lien entre urbanisation et invasion 174
Axe 2 : Dispersion des espèces du complexe 175
Axe 3 : Impact des espèces invasives 181
3. Perspectives & Pistes de recherche 186
3.1. Aire d'origine des espèces invasives du complexe 186
3.2. Étude de la compétition, interaction entre fourmis 186
3.3. Étude du développement des espèces du complexe Tapinoma nigerrimum en fonction des types de sols 187
3.4. Étude de la tolérance thermique 190
Conclusion 190

RÉFÉRENCES 192

LISTE D'ARTICLES & ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT ET D'ENCADREMENT 224

ANNEXE 228

INTRODUCTION GENERALE

1. Changements globaux et crise de la biodiversité

Depuis de nombreuses années, la biodiversité est affectée par de fortes pressions d'origine anthropiques attribuables à un ensemble de causes majeures ; la modification, la dégradation et la fragmentation des habitats, la pollution, les invasions biologiques, les changements climatiques et la surexploitation des ressources naturelles (Bertelsmeier, 2013 ; Bertelsmeier et al., 2016 ; Tittensor et al., 2014). Ces changements globaux rapides et de grande ampleur sont visibles à l'échelle mondiale avec des conséquences sur tous les compartiments de la biodiversité : les écosystèmes, les espèces et les gènes (Steffen et al., 2015 ; Venter et al., 2016). Ils affectent la reproduction, la survie ou encore le développement des espèces en entraînant ainsi des variations de leurs effectifs : prolifération d'une minorité d'entre elles (les espèces domestiquées, cultivées ou commensales), diminution de la majorité allant parfois jusqu'à l'extinction provoquant par la même occasion une perte de services écosystémiques (Chambres, 2017 ; Thompson et al., 2012). En effet, nous observons aujourd'hui un taux d'extinction d'espèces 1000 à 10 000 fois plus fort que les taux d'extinctions à d'autres périodes (Pereira et al., 2010). On parle de la 6ème crise d'extinction de la biodiversité (Barnosky et al., 2011 ; Chapin et al., 2000). L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) estime qu'actuellement un tiers des espèces d'amphibiens, un quart des mammifères et plus d'un oiseau sur dix sont menacés d'extinction (Figure 1).

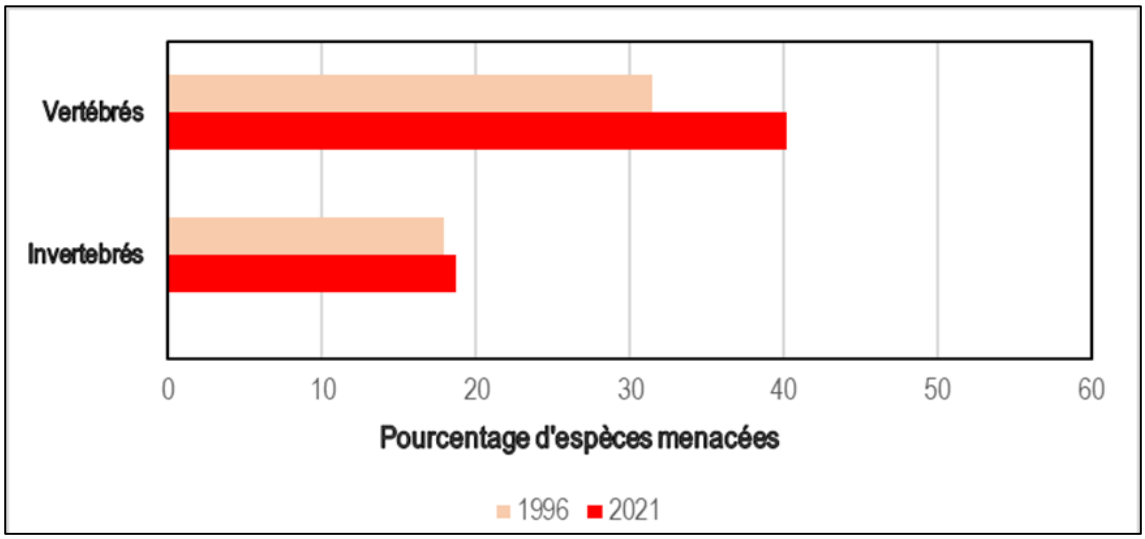


Figure 1 : Graphique représentant le pourcentage d'espèces menacées dans le monde selon l'IUCN pour 2 grands groupes d'organismes, la barre beige représente l'année 1996 et la barre rouge l'année 2021 (l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN), 2021).

Moins documentée que pour les vertébrés, cette crise touche également les insectes (Figure 2) (Dunn, 2005 ; Hallmann et al., 2017) qui représentent pourtant la majorité des organismes du règne animal avec 1 million d'espèces décrites et 5,5 millions d'espèces estimées (Stork, 2009 ; Stork et al., 2015 ; Wilson, 1987). De plus, les rares travaux font état d'une diminution de 80 % des effectifs d'insectes en 30 ans (Hallmann et al., 2017 ; Sánchez-Bayo & Wyckhuys, 2019) qui jouent pourtant un rôle majeur dans le fonctionnement des

écosystèmes (pollinisation, recyclage de la matière organique, …). Certains auteurs n'hésitent plus à parler d'apocalypse des insectes[1].

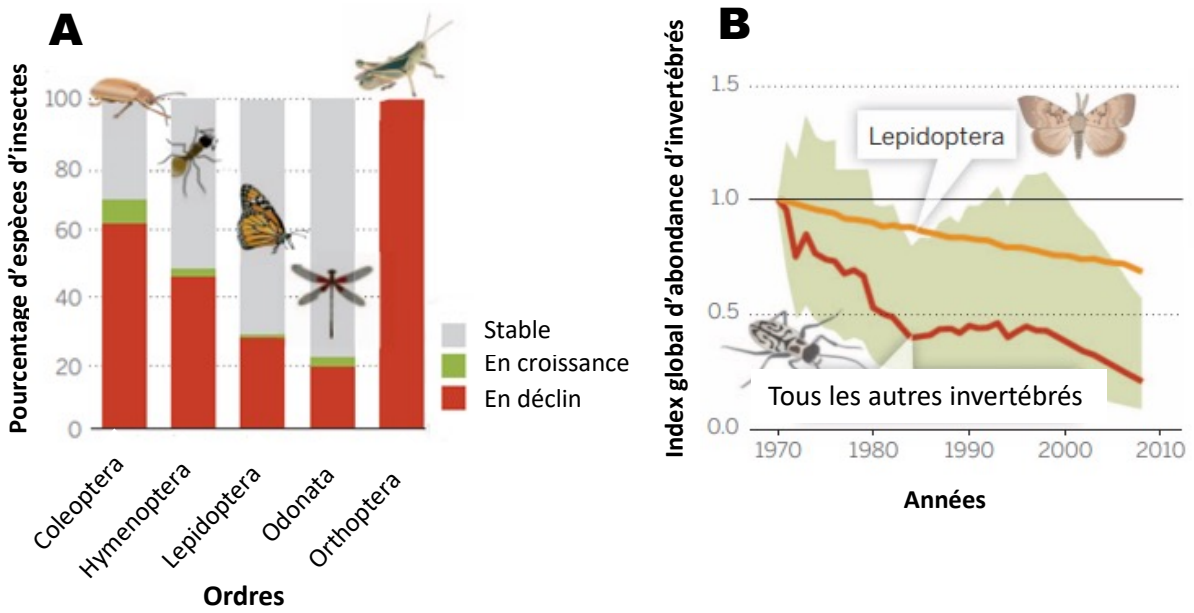


Figure 2 : A) Graphique représentant les tendances IUCN des populations appartenant aux groupes d'insectes les plus étudiés. B) Graphique représentant l'index global de l'abondance d'invertébrés à l'échelle mondiale de 1970 à 2010, montrant un déclin global de 45 %. La courbe orange représente les lépidoptères et celle en rouge, tous les autres invertébrés (modifié de Dirzo et al., 2014).

Ces menaces, qui affectent la biodiversité, ont pour origine commune l'accroissement de la population humaine mondiale qui implique des besoins importants, augmentant la surproduction et la surconsommation surtout au niveau des pays développés (Vitousek et al., 1997).

Ainsi l'urbanisation croissante, à travers ses perturbations, impose de nouvelles conditions qui peuvent favoriser la prolifération d'espèces qu'on nomme invasives. Ces deux facteurs, l'urbanisation à travers la destruction des habitats qu'elle engendre et les invasions biologiques sont les premières causes majeures de perte de biodiversité à l'échelle mondiale (Mack et al., 2000).

Nous avons donc choisi d'étudier en particulier la relation entre ces deux moteurs de la crise de la biodiversité afin de mieux les comprendre et les appréhender (Cadotte et al., 2017 ; McKinney, 2006).

[1] https://www.nytimes.com/2018/11/27/magazine/insect-apocalypse.html

2. L'urbanisation

2.1. Définition

Provoquée par des migrations rurales, la proportion d'humains vivant dans les villes a fortement augmenté depuis deux siècles, au point que les villes sont devenues l'habitat majoritaire de l'espèce humaine, la part des humains y vivant ayant dépassé le seuil de 50% depuis 2010 (Antrop, 2004 ; Gaston, 2010). En Europe et en France, dès 1950, plus de la moitié de la population habitait en ville et ce chiffre a atteint 80 % en 2018 (Figure 3). On estime que la part des urbains devrait encore augmenter en Europe mais c'est surtout dans les pays du Sud qu'elle est en explosion. Ainsi on estime que 70% de la population mondiale sera urbaine d'ici 2030 (UNFPA, 2010).

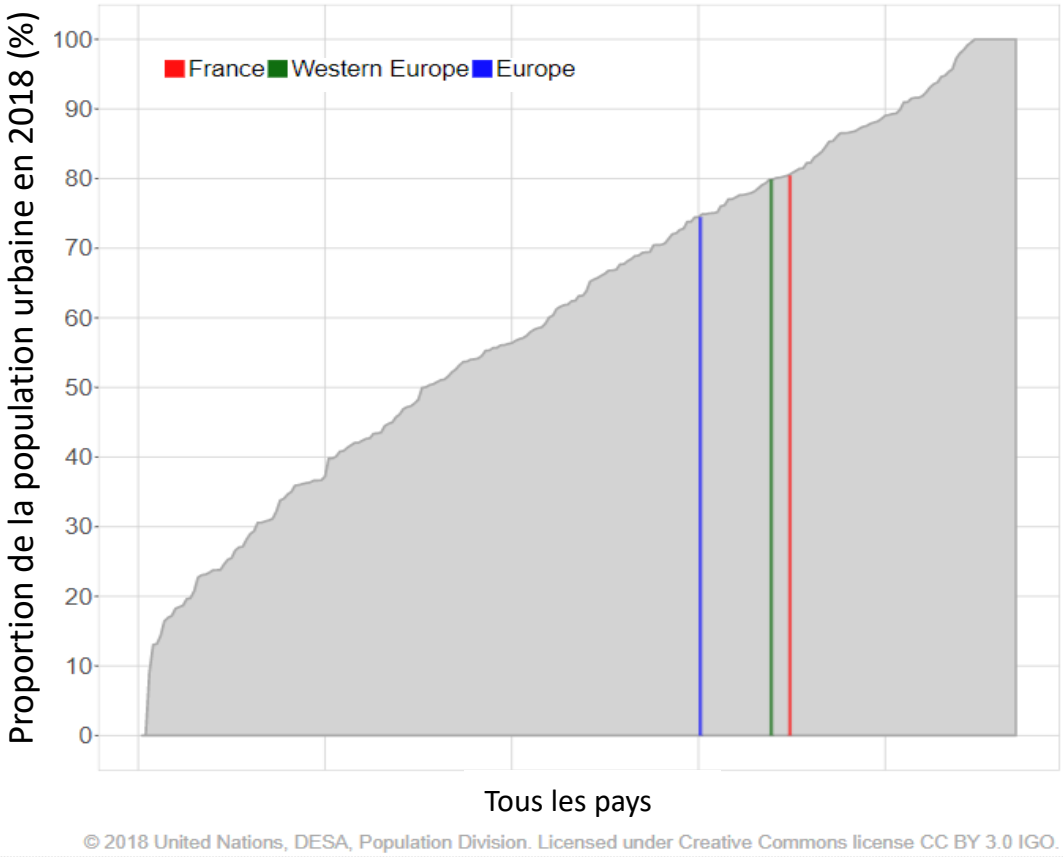


Figure 3 : Proportion de la population urbaine en 2018, en France (trait rouge), en Europe de l'Ouest (trait vert) et en Europe (trait bleu) par rapport à tous les pays du monde (zone grise). Modifié d'après United Nations, Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics, Country Profile, France (2018). http://esa.un.org/unpd/wup

L'expansion spatiale des villes est encore plus forte que la croissance démographique totale (Clergeau, 2007 ; McKinney, 2006). On parle d'étalement urbain causé, notamment, par le développement de diverses infrastructures de communication et de zones résidentielles dans les campagnes environnantes en périphérie des centres urbains plus denses et plus anciens (Clergeau, 2007 ; McKinney, 2006). En effet, l'organisation urbaine peut prendre de très nombreuses formes mais la plus répandue est celle d'une ville constituée de zones

concentriques s'étalant d'un noyau urbain dense parsemé de quelques espaces verts jusqu'à la frange rurale en passant par une zone suburbaine (Clergeau, 2007).

Cette urbanisation est également observée sur le littoral (DREAL, 2015), on parle de littoralisation. Elle consiste en la concentration de la population humaine et de ses activités sur le littoral et constitue un phénomène majeur puisque plus de 60% de la population mondiale vit sur les côtes (INSEE & SOeS, 2009). En effet, l'engouement des populations pour le climat, la valeur esthétique et récréative du littoral a développé le tourisme, encourageant la construction de stations balnéaires et de zones résidentielles (Figure 4 et 5) (Gamblin & Bruyelle, 1999 ; Renard, 1984). Tous les jours, 5 à 10 km de rivages naturels seraient artificialisés dans le monde (INSEE & SOeS, 2009). C'est notamment le cas en France où les zones côtières de la façade atlantique et du Sud ont connu une urbanisation en forte croissance à partir des années 1960 (DREAL, 2015) (Figures 4 et 5). Le littoral métropolitain présente un territoire restreint ce qui engendre une saturation de l'espace en bord de mer. Par exemple, en 2005, la façade méditerranéenne comptait 2,8 millions de résidents auxquels se sont ajoutés les touristes (INSEE & SOeS, 2009). Cette forte concentration humaine sur les côtes entraîne ainsi un haut niveau d'artificialisation du littoral, morcelant, cloisonnant et réduisant les milieux naturels par de nouvelles et diverses constructions (Figure 5 ; INSEE & SOeS, 2009).



Figure 4 : Exemples de villes urbanisées sur le littoral méditerranéen Français ; A) Marseille et B) La Grande Motte. Photos : Julia Centanni.

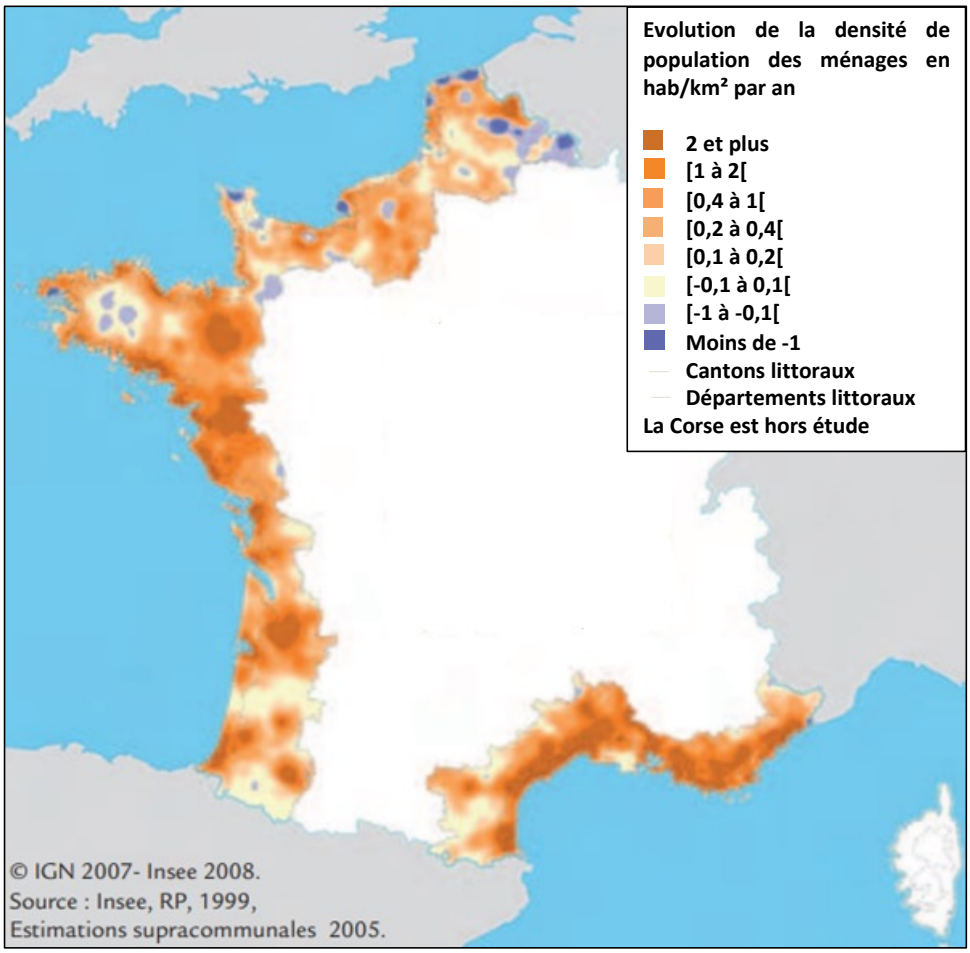


Figure 5 : Carte représentant la variation de densité de la population littorale entre 1999 et 2005 (INSEE & SOeS, 2009).

Au-delà des aspects démographiques, l'urbanisation représente un changement majeur d'occupation des sols. L'urbanisation et son étalement spatial (quartiers résidentiels, zones industrielles, centres commerciaux, …) est un processus qui génère une importante artificialisation des sols (Figure 6) (EEA, 2006 ; INSEE, 2021). Cette artificialisation correspond à la transformation souvent irréversible des surfaces naturelles ou agricoles en surfaces partiellement ou totalement imperméables (INSEE, 2021). Ces surfaces sont donc constituées de proportions élevées de bâtiments, trottoirs, parkings, infrastructures à grande échelle, réseaux de transports, …, entrecoupées d'espaces terrestres ou aquatiques plus naturels, formant ainsi une mosaïque de sols (Breuste et al., 2008 ; INSEE, 2021). Ce phénomène entraine une dégradation, une fragmentation ou une perte d'habitats naturels aux conséquences importantes sur l'environnement, les populations et leurs structurations génétiques (Bertelsmeier, 2013 ; Bertelsmeier et al., 2016 ; Grimm et al., 2008 ; Rebele, 1994 ; Tittensor et al., 2014).

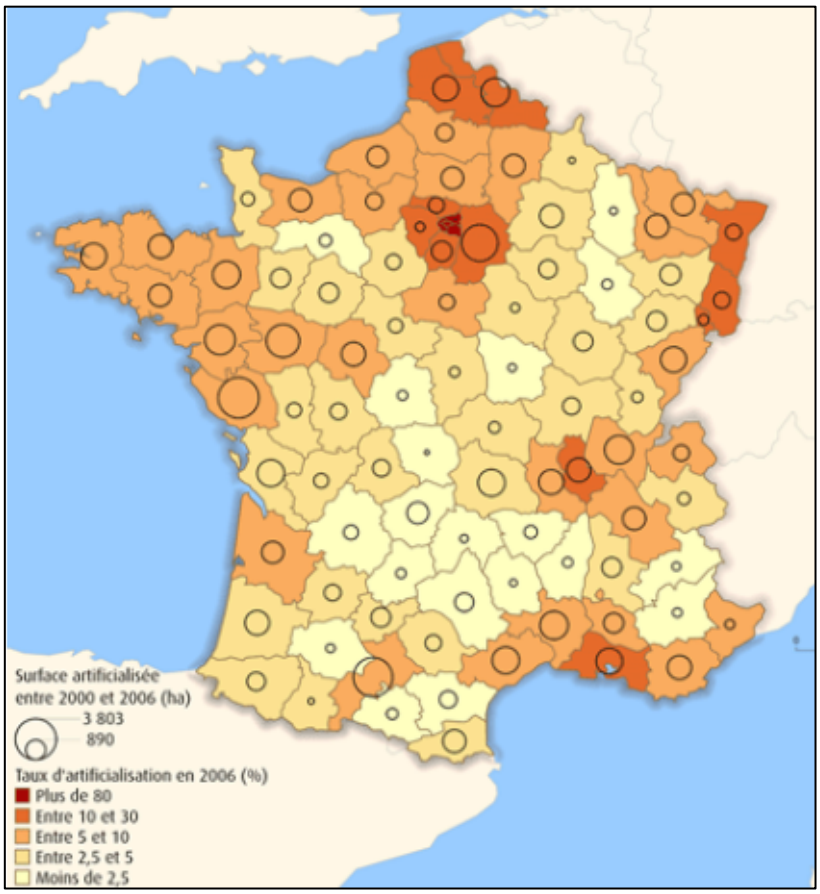


Figure 6 : Carte représentant la surface artificialisée entre 2000 et 2006 et le taux d'artificialisation en 2006 en France (SOeS, 2006).

2.2. Impacts de l'urbanisation

2.2.1. Impact de l'urbanisation sur l'environnement

L'imperméabilisation des sols engendre la destruction d'habitats plus naturels (Antrop, 2004 ; McKinney, 2006), ce qui perturbe les communautés qui y vivent (Vergnes et al., 2014). Ainsi, les espaces verts présents en ville sont moins riches que les paysages naturels (Buczkowski & Richmond, 2012) et souvent fragmentés (Clergeau, 2007). La pollution lumineuse et sonore (circulations intenses) constante des villes a aussi une répercussion sur tous les organismes en modifiant leurs comportements (communications, désorientations, activités nocturnes, …) (Longcore & Rich, 2004 ; Warren et al., 2006). La pollution chimique affecte l'air mais également le sol qui est souvent remanié et moins drainé et dans lequel on peut retrouver divers éléments traces métalliques (cuivre, fer, arsenic, zinc, plomb, …) et produits chimiques, nocifs pour la biodiversité (Bonil et al., 1988 ; Lovett et al., 2000 ; Pouyat et al., 2006). Les sols urbains ont également tendance à avoir un pH basique en raison des matériaux utilisés pour la construction comme le ciment (Vergnes, 2020). Les sols peuvent donc être fortement modifiés et perturbés par les activités humaines à travers le tassement, l'apport de débris de constructions, de déchets, l'excavation, altérant ainsi les nombreux services qu'ils fournissent (Morel et al., 2015 ; Vergnes, 2020).

L'importante minéralisation des villes augmente les risques d'inondations, diminue l'évapotranspiration du sol et des plantes et absorbe les rayonnements solaires (Dousset et

al., 2011 ; Gago et al., 2013). Ces processus entrainent, entre autres, une accumulation de chaleur plus forte en ville qu'à la campagne, de jour comme de nuit, on parle d'îlots de chaleur urbain (Figure 7) (Dousset et al., 2011 ; Gago et al., 2013). Les températures peuvent atteindre jusqu'à 10°C en plus dans les zones urbaines par rapport aux zones rurales (Gaston, 2010).

L'ensemble des perturbations environnementales engendrées par l'urbanisation affectent directement et de manière importante les populations et leurs structurations génétiques.

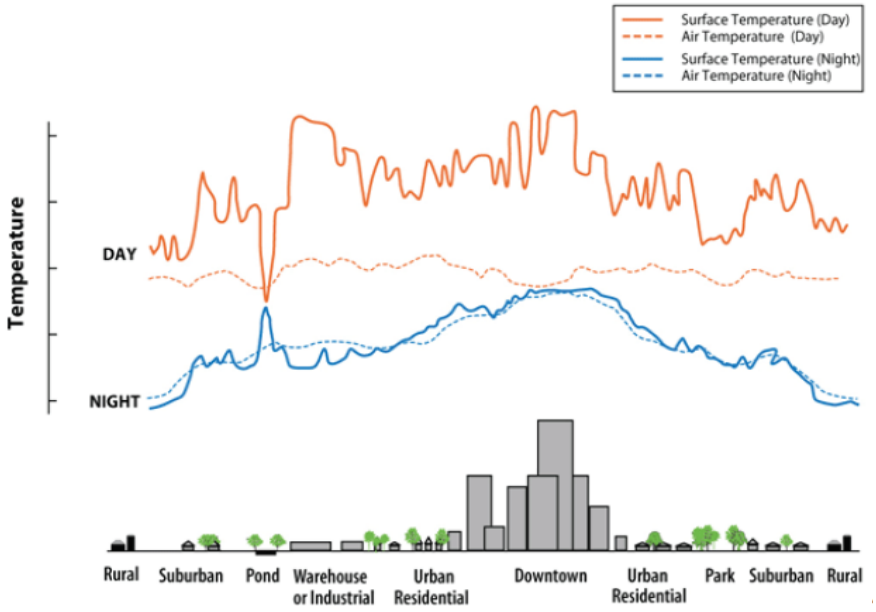


Figure 7 : Schéma représentant la température de l'air le jour (courbe orange) et la nuit (courbe bleue) (Gippet, 2016).

2.2.2. Impact de l'urbanisation sur les populations

Globalement, l'urbanisation, à travers les effets engendrés sur l'environnement, provoque la perturbation des écosystèmes et impacte profondément la biodiversité (Grimm et al., 2008 ; McDonnell & Hahs, 2008 ; McKee et al., 2004 ; McKinney, 2002 ; McKinney, 2006 ; New, 2015 ; Vitousek et al., 1997). Il existe de nombreux exemples, comme le déclin des araignées en Angleterre affectées par la pollution de l'air (Bristowe, 1939), ou encore la perte de diversité d'arthropodes provoquée par la présence de métaux lourds (Gilbert, 1971). La présence de béton rend également la surface du sol impénétrable aux précipitations et aux nutriments, ce qui affecte la viabilité des végétaux et la faune (Speight et al., 1998). Les sols urbains peuvent aussi être cloisonnés ce qui réduit l'espace de vie des espèces vivant dans les sols. Les surfaces végétales, dans les villes, sont souvent peu étendues, fractionnées et peu diversifiées. Sous forme de parcs, jardins, espaces verts, zones récréatives, elles peuvent offrir des refuges pour certaines espèces (McKinney, 2002 ; McIntyre, 2000 ; Pickett et al., 2011).

La réponse à l'environnement urbain n'est donc pas la même pour toutes les espèces. Blair (1996) a identifié trois types de réponses des espèces aux milieux urbains (Figure 8) :

- Les urbanophobes (ou « urban avoiders ») sont des espèces qui montrent une réponse très négative dès les premiers signes d'urbanisation. Cette catégorie concerne la majorité des espèces (Blair, 1996). Ce sont de nombreuses espèces que l'on trouve notamment au cœur d'habitats forestiers (par exemple, les grands mammifères, de nombreux insectes forestiers, des oiseaux insectivores, …).

- Les espèces modérément urbanophiles (ou « urban adapters ») sont des espèces présentes à des niveaux intermédiaires d'urbanisation (zone périurbaine et suburbaine) mais qui vivent également dans des zones plus naturelles (ex : les ratons laveurs *Procyon lotor*, les rouges-gorges *Erithacus rubecula*, les fourmis *Formica japonica*) (Yamamoto et al., 2013).

- La dernière catégorie est celle des urbanophiles (ou « urban exploiters ») dont l'abondance est maximale dans les zones les plus fortement urbanisées dépendant presque entièrement des ressources humaines (par exemple, les souris domestiques *Mus musculus*, les moineaux domestiques *Passer domesticus*, les fourmis *Tetramorium immigrans*) (Blair, 1996 ; Cordonnier et al., 2019 ; Kühn et al., 2004 ; Witte et al., 1985).

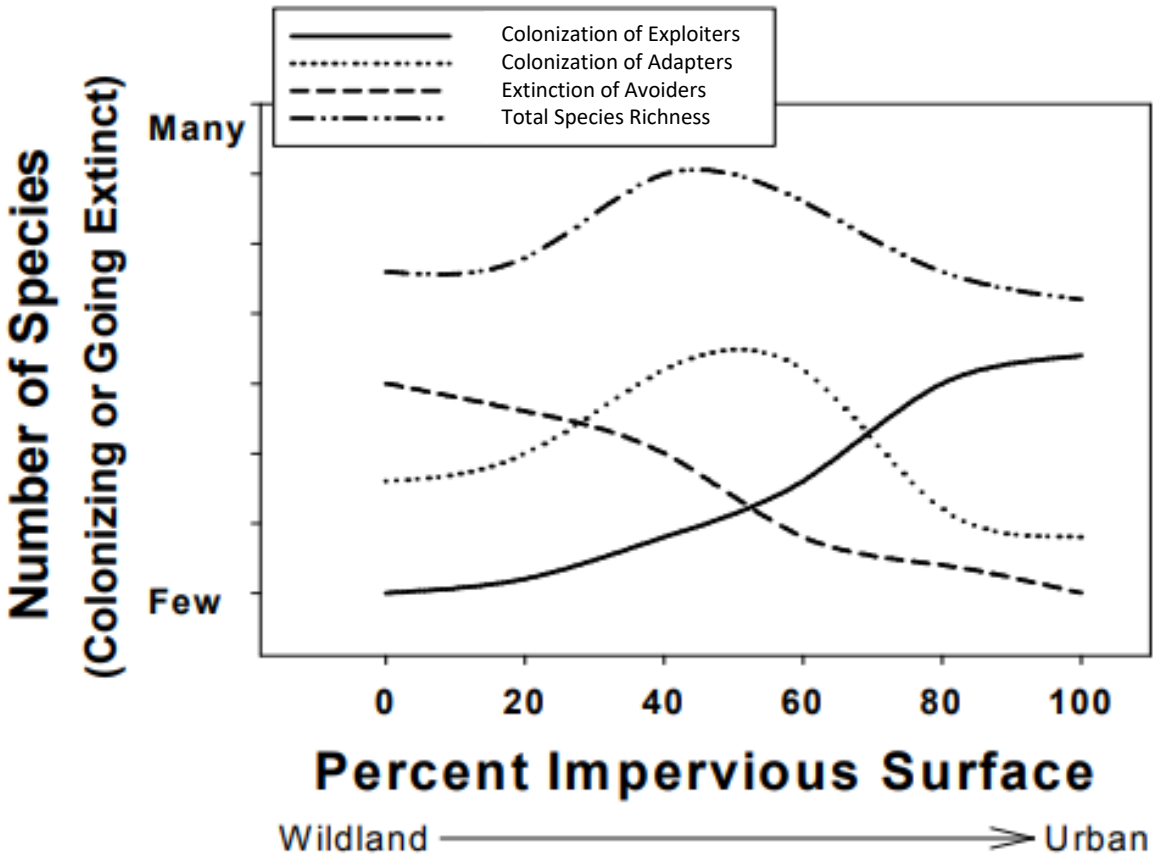


Figure 8 : Graphique représentant les réponses généralisées des populations ou individus *exploiters* (courbe ligne pleine), *adapters* (petits pointillés), ***avoiders*** (grand pointillés) le long d'un gradient d'urbanisation. On retrouve principalement des *urban avoiders* entre 0-20% de surfaces imperméables, des *urban adapters* entre 30 à 60 % de surfaces imperméables et enfin des *urban exploiters* sur >70% de surfaces imperméables (Adapté de Marzluff & Rodewald, 2008).

La combinaison des trois types de réponses à l'urbanisation permet de comprendre comment un pic de diversité peut être observé à des niveaux intermédiaires d'urbanisation (Figure 8). Les villes peuvent offrir des opportunités pour quelques espèces qui tolèrent ces conditions (espèces urban adapters et urban exploiters) (Cadotte et al., 2017 ; Gippet et al., 2019 ; Lefeuvre, 2013 ; McKinney, 2006). En effet, des espèces plus généralistes, plus compétitrices ou opportunistes seraient plus aptes à survivre dans ce nouvel environnement (Spear et al., 2013), notamment par la création de nouveaux habitats présentant une combinaison de caractéristiques propres aux villes (McKinney, 2006 ; McKinney, 2008), L'intensification des échanges, l'absence ou la diminution de prédateur et l'accès à de nouvelles ressources alimentaires disponibles comme les déchets peuvent profiter à ces espèces (Cadotte et al., 2017 ; McKinney, 2006 ; McKinney, 2008). On peut citer par exemple le pigeon biset *Columbia livia* ou le chat féral (chat retourné à la vie sauvage après avoir été domestiqué) *Felis catus*, dont les populations atteignent de grandes densités dans les zones urbanisées et qui utilisent les ressources et les abris fournis par les humains (McKinney, 2006). Certaines espèces de plantes qui recherchent des pH élevés peuvent aussi s'épanouir dans les sols urbains rendus alcalins par la présence du béton (Gilbert, 1989).

L'environnement urbain est devenu rapidement un ensemble de filtres environnementaux (abiotiques et biotiques) forts qui ont tendance à être homogènes entre des villes situées dans des contextes biogéographiques différents, c'est la convergence urbaine (Keddy, 1992 ; Pouyat et al., 2003). En conséquence, en fonction de leurs caractéristiques écologiques, les espèces seront sélectionnées ou non par ces filtres (McKinney, 2008). Ce syndrome de traits urbains associé au processus de convergence urbaine explique que des villes situées dans des zones géographiques différentes possèdent des faunes et des flores dominées par les mêmes espèces (McKinney, 2006 ; Parker & Nilon, 2008). Effectivement, les villes sont le cœur de grands centres d'activités et d'échanges terrestres, aériens, fluviaux et maritimes, amplifiant le transport de marchandises à plusieurs échelles et provocant donc le déplacement accidentel ou volontaire d'espèces à longues ou courtes distances (Gaston, 2010 ; Gippet et al., 2019 ; Hulme, 2009). Ainsi, à l'échelle mondiale, l'urbanisation participe à l'homogénéisation biotique (McKinney & Lockwood, 1999 ; McKinney, 2006).

2.3. Effets de l'urbanisation sur la structure génétique

L'urbanisation joue également un rôle sur la structuration génétique des populations. Effectivement, l'urbanisation, avec la construction de bâtiments et de routes, engendre la fragmentation du paysage ce qui crée des barrières qui isolent les populations et entraîne une réduction du flux génétique entre elles (Figure 9) (Clergeau, 2007 ; Colyn et al., 2015 ; Miles et al., 2019). Cette matrice urbaine est donc très hostile aux déplacements actifs et à la survie de la majorité des organismes et plus particulièrement pour les espèces à la dispersion naturelle plus réduite comme c'est le cas pour les arthropodes qui vivent à la surface du sol par exemple (Vergnes et al., 2013). Ces barrières (routes, bâtiments …) peuvent ainsi affaiblir la connectivité entre les habitats favorables, ce qui peut diminuer la taille des populations et la fréquence des échanges (Bierwagen, 2007 ; Collins et al., 2000). L'isolement géographique des populations conduit donc à une forte différenciation génétique et peut à terme provoquer l'extinction des petites populations (Deichsel, 2006 ; Gibb & Hochuli, 2002 ; Pirnat, 2000 ; With & King, 1999). Par exemple, la fragmentation urbaine a augmenté la différenciation génétique entre les populations urbaines de mulots rayés (*Apodemus agrarius Pallas*) par rapport aux populations rurales (Gortat et al., 2013). Les échanges génétiques sont en effet essentiels car ils apportent une certaine diversité ce qui évite la consanguinité à court terme et permettent aux espèces de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales à long terme (Fischer & Lindenmayer, 2007).

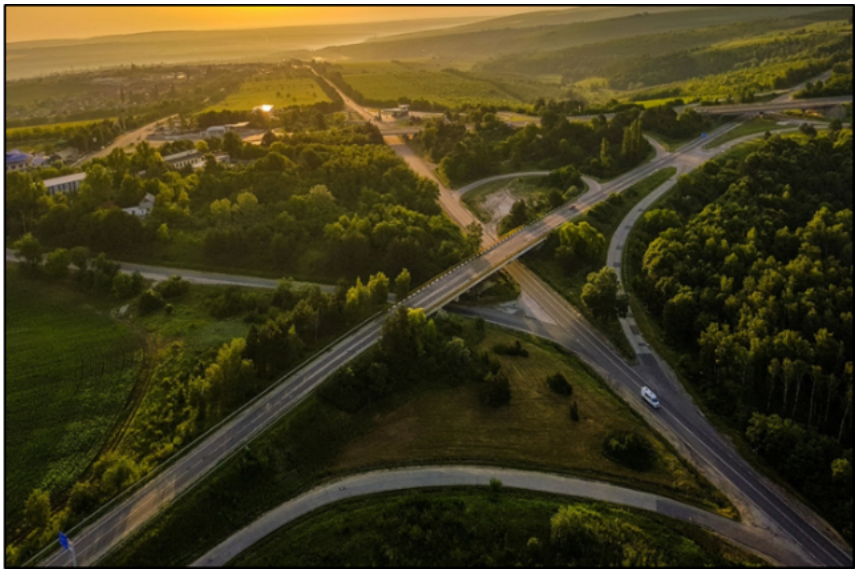


Figure 9 : Exemple de paysage fragmenté par des routes. (Photo libre de droit de unsplash ; https://unsplash.com/).

Cependant, l'urbanisation peut aussi faciliter la dispersion entre les populations (Miles et al., 2019). Effectivement, les activités humaines, à travers le tourisme ou encore les échanges commerciaux, constituent aussi de véritables corridors qui engendrent le déplacement d'espèces dans de nouveaux environnements et à plus longues distances (Gippet et al., 2019 ; Mount & Pickering, 2009 ; Wichmann et al., 2009). L'urbanisation peut ainsi favoriser certaines espèces par le franchissement des barrières géographiques (Auffret et al., 2014 ; Frantz et al., 2009 ; Gippet et al., 2019 ; Heterick et al., 2013 ; Hodkinson & Thompson, 1997).

La propagation des espèces invasives peut alors être facilitée (Pauchard et al., 2009). Par exemple, les transports y contribuent, c'est le cas de la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) qui se fixe sur les coques des bateaux et remonte ainsi les rivières en passant d'un bassin versant à un autre (Johnson et al., 2006). Le transport de plantes ou de matériaux a permis par exemple le déplacement de reines de fourmis *Lasius neglectus* qui n'effectuent pas de vols nuptiaux (Espadaler & Rey, 2001).

Cependant, l'effet de l'urbanisation sur les flux génétiques ne repose pas seulement sur les capacités de dispersion mais dépend également de l'adaptation des espèces aux conditions urbaines, déterminant le nombre de patchs occupés et la taille des populations (Miles et al., 2019). Ainsi la réponse à la fragmentation urbaine, c'est-à-dire les niveaux de flux de gènes entre populations est le résultat d'une combinaison plus complexe de ces deux traits biologiques majeurs.

3. Les invasions biologiques

En perturbant directement ou indirectement les barrières naturelles, l'urbanisation, degré extrême d'anthropisation, intensifie souvent la dynamique des invasions biologiques

(Bertelsmeier & Courchamp, 2014 ; Cadotte et al., 2017 ; Holway et al., 2002 ; McKinney, 2006 ; Pickett et al., 2011).

La définition des espèces invasives suscite encore quelques désaccords parmi la communauté scientifique. En effet, une partie définit les espèces invasives comme exotiques à leur lieu d'invasion (Richardson et al., 2000), c'est la définition la plus courante. Mais elle exclut la prolifération d'espèces locales.

Nous suivrons ici la position de Davis & Thompson (2001) et Valéry et al. (2008) qui considèrent qu'il ne faut pas distinguer la prolifération d'espèces indigènes de la prolifération d'espèces exotiques. Cette définition n'exclut donc pas les espèces natives. Effectivement, la capacité de prolifération ou la nuisance ne sont pas limitées aux espèces exotiques (Thompson et al., 1995). Une espèce locale peut coloniser et dominer un nouvel habitat proche de son aire d'origine (Davis & Thompson, 2001 ; Thompson et al., 1995). En ville, elle peut s'installer dans des milieux vierges et peut donc occuper une niche écologique nouvelle et vacante. De plus, il est difficile d'identifier l'origine géographique des espèces cryptogéniques (Carlton, 1996). L'acception large de la notion d'espèce invasive permet de simplifier l'approche et de s'attacher à l'essentiel : caractériser les capacités de prolifération (et les traits biologiques associés) et étudier les possibles conséquences écologiques de la prolifération.

Les invasions biologiques, selon Valéry et al. (2008), sont donc associées à des espèces qui peuvent être natives ou introduites et qui acquièrent un avantage compétitif de par la disparition de barrières qui limitaient leur dispersion ou leur prolifération. Elles peuvent alors se répandre dans de nouvelles zones ou habitats et atteindre une densité élevée et ainsi accroître leur aire de répartition. Elles peuvent engendrer des dégâts sanitaires et socio-économiques importants (Pimentel et al., 2005 ; Thévenot, 2013). Ces espèces, appelées aussi espèces envahissantes (Thévenot, 2013), prolifèrent et modifient le fonctionnement des écosystèmes (Williamson, 1996). Les espèces invasives peuvent accaparer les ressources locales, conduire à l'exclusion compétitive (Bøhn et al., 2008), faciliter de nouvelles invasions (O'Loughlin & Green, 2017) et déclencher des effets en cascades au niveau des réseaux trophiques (Estes et al., 2011). Après la destruction des habitats elles sont la deuxième cause de disparition des espèces (Mack et al., 2000 ; Vitousek et al., 1997 ; Williamson, 1996). Aujourd'hui, 16% des hotspots de biodiversité et 17% de la surface terrestre sont vulnérables aux invasions biologiques (Early et al., 2016). La zone méditerranéenne et les zones tempérées de l'hémisphère sud sont particulièrement touchées par ces invasions biologiques (Sala et al., 2000).

Malgré le fait que les invasions biologiques existent naturellement et depuis longtemps, elles se sont fortement accélérées avec les activités humaines qui ont participé à l'amplification des déplacements des espèces en leur permettant de franchir des barrières jusqu'alors infranchissables (Suarez et al., 2001). En effet, depuis 1960, les flux migratoires se sont

accélérés avec l'intensification des échanges commerciaux et touristiques (Perrings et al., 2005). Cette dispersion d'espèces par les activités humaines est appelée dispersion à médiation humaine (HMD) (Auffret et al., 2014 ; Gippet et al., 2019).

On peut citer de multiples exemples d'espèces invasives connues et préoccupantes en France, allant des plantes aux animaux, comme le moustique tigre *Aedes albopictus* qui s'est propagé sur tous les continents excepté en Antarctique (Medley et al., 2015), la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* qui pose des problèmes d'ordre environnemental en s'attaquant aux coccinelles locales (Lefeuvre, 2013 ; Martin et al., 2005 ; Menozzi, 2010), le frelon à pattes jaunes (*Vespa velutina*) qui s'attaque à l'abeille domestique (*Apis mellifera*) (Monceau et al., 2014), ou encore les termites (*Blattodea*) qui provoquent d'immenses dégâts dans les habitations (Evans et al., 2011).

L'urbanisation semble sélectionner des traits invasifs chez certaines espèces comme la capacité d'adaptation aux milieux perturbés, une reproduction et une croissance rapide, ainsi qu'une résistance à des prédateurs ou le développement de comportements agressifs envers les autres espèces (Blight et al., 2017 ; Holway et al., 2002). Le succès de ces espèces est donc influencé par de nombreux facteurs comme la dispersion par l'homme, la réduction de la compétition ou de la prédation, les ressources particulières et les conditions environnementales altérées (par exemple températures hautes) (Cadotte et al., 2017 ; Shea & Chesson, 2002).

Les insectes sociaux sont un groupe qui présente de nombreuses invasions (Moller, 1996), dues en grande partie à une combinaison de traits facilitant leur expansion dans de nouveaux habitats (Holway et al., 2002 ; Kark et al., 2007). En effet, les insectes présentent une capacité à être disséminés involontairement, notamment de part leurs petites tailles. De plus, ceux vivants dans les sols et dans le matériel végétal sont souvent dissimulés et facilement transportés (Moller, 1996). La capacité de développer des propagules apporte également un avantage. Chez les fourmis, la modification du comportement social et la structure coloniale comme la formation de supercolonies contribuent à leur succès (Tsutsui & Case, 2001), tout comme la polygynie (nombreuses reines) offre une capacité de dispersion grandement facilitée par l'homme (Moller, 1996).

En effet, parmi les espèces invasives, les organismes du sol et plus particulièrement les espèces ingénieurs, comme les fourmis, nécessiteraient une attention plus soutenue en raison des modifications au demeurant moins visibles mais pourtant cruciales sur l'ensemble de l'écosystème et sur le réseau trophique (Bohlen, 2006).

4. Les fourmis

4.1. Généralités

Malgré le rôle essentiel de la biodiversité des sols au sein du fonctionnement des écosystèmes, les organismes des sols et leurs réponses aux changements globaux restent peu abordés (Cameron et al., 2018). McIntyre (2000) a également montré qu'il existait peu d'études générales sur les arthropodes en milieu urbain, la plupart portant sur les espèces qui transmettent des maladies aux hommes ou au bétail ou qui altèrent les cultures agricoles. Pourtant, avec leurs cycles de vie courts, les fourmis peuvent répondrent rapidement aux effets de l'urbanisation et pourraient représenter de bons indicateurs des conséquences de l'urbanisation sur la biodiversité (McIntyre, 2000).

Les fourmis sont des insectes qui constituent la famille des Formicidae appartenant à l'ordre des Hymenoptera. Dépassant rarement les deux centimètres, les fourmis représentent pourtant une importante biomasse dans la quasi-totalité des écosystèmes terrestres excepté dans les zones polaires et glaciaires permanentes comme au Groenland et en Antarctique (Figures 10 et 11) (Hölldobler & Wilson, 1990 ; Tuma et al., 2020 ; Wilson & Taylor, 1967). Elles ont colonisé une grande diversité d'habitats allant des milieux naturels comme les forêts, les dunes, la savane, aux zones plus anthropisées comme les villes (Vergnes et al., 2017). Etant donné leur répartition, leur abondance, leurs interactions avec les autres espèces, elles font partie des organismes dominants sur Terre (Passera & Aron, 2005 ; Wilson & Hölldobler, 2005). Il existe plus de 13 000 espèces de fourmis décrites dans le monde (Bolton, 2016) mais il y en aurait plus de 25 000 (Lach et al., 2010).

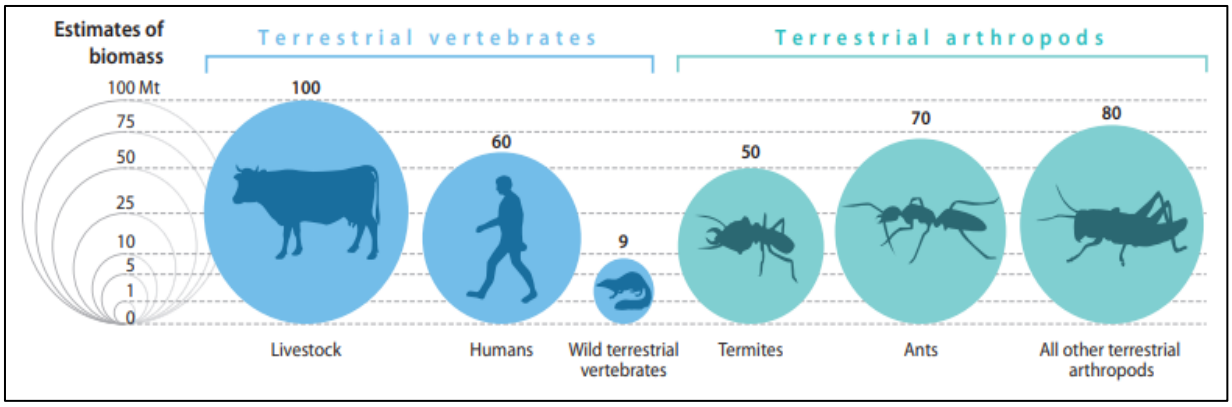


Figure 10 : Estimations de la biomasse des vertébrés et de celle des arthropodes (Eggleton, 2020 ; modifié de Tuma et al., 2020).

Les fourmis ont un rôle majeur au sein des écosystèmes à tel point qu'elles sont considérées comme des ingénieurs des écosystèmes c'est-à-dire qu'elles modifient profondément les propriétés biotiques et abiotiques du milieu, elles sont impliquées dans de nombreux processus écosystémiques (Blouin et al., 2013 ; Folgarait, 1998 ; Jones et al., 1994) et sont des organismes « clés de voûte » (Hölldobler & Wilson, 1990 ; Wilson & Hölldobler, 2005). Elles assurent une variété de fonctions écologiques et d'interactions multitrophiques (Agosti

et al., 2000 ; Blatrix et al., 2013 ; Guénard et al., 2017 ; Hölldobler & Wilson, 1990 ; Wilson & Hölldobler, 2005). En effet, les fourmis qui vivent dans les sols (et qui représentent la majorité) à travers les structures qu'elles créent (nids, galeries …), fournissent de nombreux services en modifiant les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols (pH, température, humidité, éléments nutritifs, activité microbienne, ...), en recyclant les nutriments dans les sols, par la régulation des populations de nombreux insectes et/ou par le mutualisme avec des champignons, des animaux ou des plantes (comme la dispersion des graines, la protection des pucerons contre les prédateurs par exemple) (Frouz & Jilkova, 2008 ; Hölldobler & Wilson, 1995 ; Holway et al., 2002 ; Lach et al., 2010).

Leur dispersion, très souvent fortuite, est facilitée, par l'homme lors de ses déplacements ou lors de transports de matériel, notamment végétal (Bertelsmeier et al., 2016).

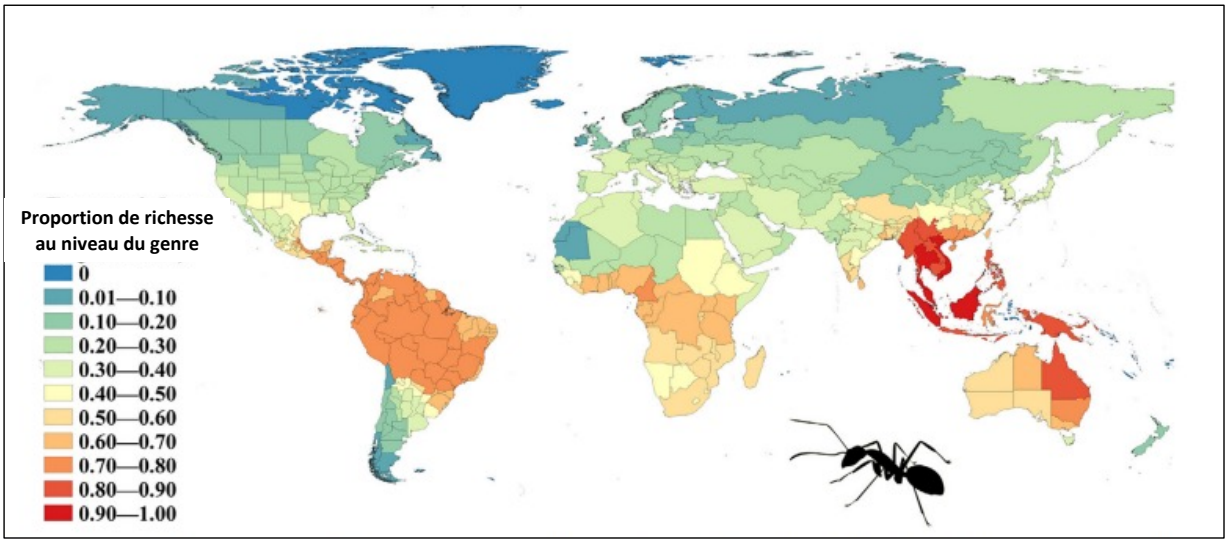


Figure 11 : Modèles de richesse globale au niveau du genre pour les fourmis (Tuma et al., 2020). Les données proviennent du Global Ant Biodiversity Informatics (GABI) (Guénard et al., 2017). On remarque qu'une grande diversité d'espèces est observée majoritairement dans la zone tropicale. Tandis que la partie la moins riche est située au niveau de la zone polaire et subpolaire.

4.2. Les fourmis invasives

Les fourmis invasives sont unicoloniales et forment des supercolonies (Glossaire myrmécologique), elles se caractérisent par leur agressivité lors des rencontres interspécifiques (Holway & Suarez, 1999 ; Tsutsui & Case, 2001) et sont transportées lors d'échanges commerciaux (Passera & Aron, 2005). Elles peuvent avoir un impact sur la biodiversité et entrainent également parfois des répercussions sur un plan socio-économique (Holway et al., 2002). Les fourmis invasives peuvent donc affecter certaines espèces (y compris d'autres fourmis) en monopolisant rapidement les ressources ou par leur agressivité, en appauvrissant leur nombre d'individus voire en entrainant leur extinction ce qui affecte le bon fonctionnement des écosystèmes dotés d'une biodiversité préexistante (Williamson, 1996). Parmi les fourmis invasives on distingue les espèces vagabondes qui possèdent une caractéristique supplémentaire qui correspond à leur commensalisme avec

l'homme, au niveau de leur source de nourriture et de leur nidification (Passera & Aron, 2005). Elles peuvent ainsi se déplacer à travers les activités humaines et ont aussi la facilité de coloniser des habitats perturbés comme les milieux urbains appauvris en biodiversité (Passera & Aron, 2005).

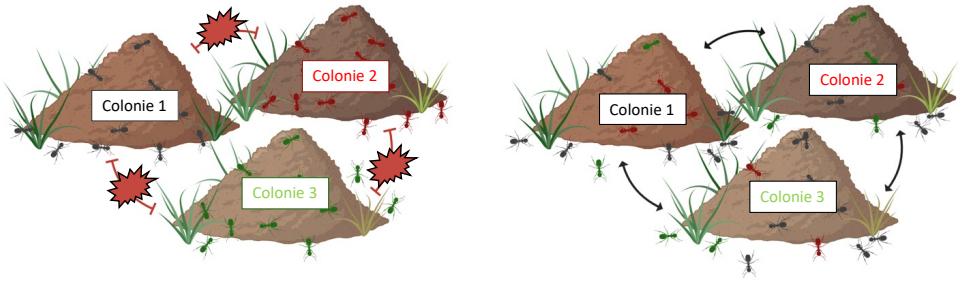
On peut citer quelques exemples d'espèces de fourmis invasives connues et redoutées (Tableau 1) : la fourmi d'Argentine (*Linepithema humile*), la fourmi de feu (*Solenopsis invicta*), la fourmi à grosse tête (*Pheidole megacephala*), la petite fourmi de feu (*Wasmannia auropunctata*), la fourmi envahissante des jardins (*Lasius neglectus*) et la fourmi folle jaune (*Anoplolepis gracilipes*) (Lowe et al., 2000). Par exemple cette dernière est réputée pour avoir rapidement tué, en 18 mois, 3 millions de Crabes rouges, *Gecarcoidea natalis*, endémiques de l'île Christmas en Australie (Lowe et al., 2000 ; O'Dowd et al., 2003). Elles s'attaquent également à divers arthropodes, oiseaux, reptiles et mammifères vivants au sol (Lowe et al., 2000). Concernant, *Pheidole megacephala* celle-ci prospère dans les habitats perturbés, s'introduit souvent dans les habitations et se nourrit de détritus alimentaires (Huddleston & Fluker, 1968 ; Wetterer, 2007). Lorsqu'elle est présente à forte densité, il y a peu d'invertébrés indigènes qui persistent (Wetterer, 2007). De plus cette espèce, favorise l'augmentation d'hémiptères qui se nourrissent de plantes, elle est donc un ravageur indirect agricole sur diverses cultures (café, ananas, …) (Fluker, 1968). La petite fourmi de feu, ravageur agricole également, engendre aussi des impacts négatifs sur de nombreuses espèces, vertébrées comme invertébrées. Très compétitive, elle domine et élimine les fourmis indigènes. Elle est connue pour sa piqûre très urticante (Wetterer & Porter, 2003). *Solenospsis invicta* a un impact négatif sur la diversité et l'abondance des arthropodes ainsi que sur l'agriculture et la santé humaine, en raison de sa piqûre nocive (Wang et al., 2019). La fourmi d'Argentine réduit également la diversité des fourmis indigènes et impacte l'agriculture indirectement et particulièrement les vignes et agrumes en raison de son association avec les hémiptères, elle s'installe aussi dans les habitations (Heller, 2004 ; Silverman & Brightwell, 2008). L'espèce *Lasius neglectus* s'est rapidement repandue en Europe depuis les années 1990 et a modifié les communautés d'arthropodes en diminuant la diversité de la myrmécofaune, des coléoptères et des isopodes (Nagy et al., 2009). Elle envahit également les habitations, engendre des dégâts dans les jardins et les serres car elle protège les pucerons et peut causer des incendies par courts circuits car elle se trouve fréquemment dans les prises électriques (Rey & Espadaler, 2005 ; Seifert, 2000). Cependant, ces dernières années une diminution de ses populations est observée (Tartally et al., 2016).

Tableau 1 : Quelques exemples des fourmis invasives et leurs impacts (modifié de Bertelsmeier & Courchamp, 2014).

Photo	Nom scientifique	Nom commun	Impact sur la biodiversité	Impact économique	Impact sanitaire	Références
	*Linepithema humile*	Fourmi d'Argentine	✓	✓		Heller (2004), Silverman & Brightwell (2007)
	*Solenopsis invicta*	Fourmi de feu	✓	✓	✓	Wang et al. (2009)
	*Wasmannia auropunctata*	Petite fourmi de feu	✓	✓	✓	Wetterer & Porter (2003)
	*Pheidole megacephala*	Fourmi à grosse tête	✓	✓		Huddleston & Fluker (1968), Wetterer (2007)
	*Anoplolepis gracilipes*	Fourmi folle jaune	✓	✓	✓	Lowe et al. (2000), O'Dowd et al. (2003)
	*Lasius neglectus*	Fourmi envahissante des jardins	✓	✓		Rey & Espadaler (2005), Seifert (2000)
	*Solenopsis germinata*	Fourmi de feu tropicale	✓	✓	✓	Harris & Berry (2005)

Glossaire myrmécologique

- **Monogyne** : colonie de fourmis ne contenant qu'une seule reine.
- **Polygyne** : colonie qui contient plusieurs reines.
- **Supercolonie :** structure sociale composée de plusieurs colonies d'une même espèce présentant une faible agressivité intraspécifique et échangeant des individus entre elles. On parle de polygynie unicoloniale puisqu'au sein de la population plusieurs reines cohabitent sans limite coloniale, avec un mélange d'individus issus de différents nids, à l'inverse de l'organisation multicoloniale. Au sein de chaque nid, le nombre de reines est élevé (parfois plusieurs centaines) et l'acceptation de reines non apparentées est fréquente (Tsutsui & Suarez, 2003). Cette structure s'observe par exemple chez la fourmi d'Argentine (*Linepithema humile*) (Ward, 2009).



Organisation multicoloniale **Organisation unicoloniale**

Figure : Schéma illustrant les types unicoloniaux et multicoloniaux. Le schéma de gauche représente une organisation multicoloniale avec compétition intraspécifique. Celui de droite représente une organisation unicoloniale avec un transfert libre d'individus entre les nids des colonies différentes et une absence d'agressivité.

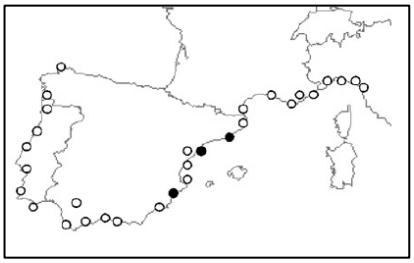


Figure : Exemple de deux supercolonies (cercles blancs et noirs), chez la fourmi d'Argentine, d'après les tests d'agression. Les cercles noirs correspondent à la supercolonie catalane et celle représentée par les cercles en blancs s'étend sur 6000 km (Giraud et al., 2002).

- **Monodomique :** la colonie ne présente qu'un seul nid.
- **Polydomique :** colonie composée de plusieurs nids.
- **Les espèces vagabondes ou *tramp species* en anglais :** Les espèces vagabondes se caractérisent par leur unicolonialité (elles forment des supercolonies sans agression), leur polygynie, leur adaptation aux milieux modifiés par l'homme, leur dispersion facilitée par les activités humaines et une agressivité interspécifique forte. Pour Passera (1994) le caractère le plus représentatif serait leur association avec l'homme notamment par la dispersion à longue distance (Holway et al., 2002).

4.3. Le cas du complexe *Tapinoma nigerrimum*

Nous nous intéressons ici plus particulièrement au complexe *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae) (Figure 12) qui est un ensemble d'espèces de fourmis apparentées vivant dans les sols. Il est composé de quatre espèces récemment séparées : *T. darioi*, *T. ibericum, T. magnum* et *T. nigerrimum* qui appartiennent à la sous famille des Dolichoderinae (Blatrix et al., 2013 ; Seifert et al., 2017). L'identification morphologique des espèces au sein du complexe *Tapinoma nigerrimum* est ardue car elles sont très proches morphologiquement et rendue encore plus difficile par la présence d'autres espèces du genre *Tapinoma*, comme *T. erraticum* ou *T. madeirense*. L'identification sûre des espèces du complexe nécessite la réalisation d'analyses génétiques, à l'aide de marqueurs microsatellites (Chapitre 1 ; Centanni et al., 2022).



Figure 12 : Deux ouvrières du complexe *Tapinoma nigerrimum* probablement en communication antennaire. Photo : Alan Vergnes.

Ces petites fourmis noires de taille réduite comprise entre 2 à 5 mm ont la particularité de posséder une odeur de beurre rance, que l'on peut distinguer après manipulation sur le terrain, qui est due à leurs phéromones de défense chimique, d'alarme et de communication qu'elles émettent à partir de leurs glandes anales (Blatrix et al., 2013 ; D'Eustacchio et al., 2019 ; Pavan & Trave, 1956). La sous famille des Dolichoderinae est effectivement capable de produire une diversité de composés volatils. D'Eustacchio et al. (2019) ont montré que

ces composés étaient qualitativement et quantitativement différents entre *Tapinoma darioi* et *Tapinoma magnum*. Cette approche biochimique permet également de différencier ces deux espèces au sein du complexe. Une étude en préparation de Lenoir & Perdereau montre que les 4 espèces du groupe *T. nigerrimum* peuvent également être séparées par leurs profils d'hydrocarbures cuticulaires (composés organiques que l'on trouve à la surface de la cuticule des arthropodes pour les protéger de la dessication et qui jouent également un rôle dans la communication entre individus).

Les quatre espèces du complexe semblent être originaires de la zone méditerranéenne (Seifert et al., 2017), mais l'identification de leurs aires d'origine précises nécessiterait un échantillonnage plus important ainsi que des études génétiques supplémentaires.

Tapinoma ibericum peut former des supercolonies et semble limitée à son aire de répartition indigène en Espagne cependant une colonie a été observée au Royaume-Uni sur l'île de Wight (Figure 13). Il existe peu d'information connue à ce jour sur son affinité avec le milieu urbain (Seifert et al., 2017). *Tapinoma nigerrimum sensus stricto* est retrouvée en Espagne et dans le sud de la France. Elle forme des colonies monodomiques qui sont agressives les unes envers les autres, occupe des habitats naturels ouverts dans la zone méditerranéenne et ne semble pas invasive (Seifert et al., 2017). *Tapinoma darioi* et *T. magnum* présentent un caractère invasif. En effet, elles forment des supercolonies, possèdent des traits d'espèces vagabondes (Figure 13 et 14) et se répandent dans le sud de la France et notamment à Montpellier (Seifert et al., 2017) ainsi que dans plusieurs villes d'Europe en dehors de leur aire d'origine (Berville et al., 2013 ; Blight et al., 2010 ; Dekoninck et al., 2015 ; Seifert et al., 2017). En Suisse, on peut trouver *T. magnum*, dans le canton de Vaud et dans les villes de Zurich et Genève. Elle y colonise des milieux urbains comme les quartiers résidentiels, les jardins et peut s'étendre parfois dans les zones cultivées à proximité (dans les vignes par exemple). Elle peut également gagner les habitations (Freitag & Cherix, 2019 ; Gippet et al., 2022). En Belgique, *T. magnum* a également été trouvée à Ostende (Dekoninck et al., 2015), aux Pays-Bas, le long des trottoirs (Noordijk, 2016), en Allemagne (Heller, 2011), ou encore en Slovénie (Bračko, 2019). *Tapinoma darioi*, elle, a été observée en France, en dehors de son aire d'origine, à Chalon-sur-Saône en région Bourgogne-Franche-Comté, en Loire-Atlantique, ainsi qu'aux Pays-Bas, à Wageningen (Gouraud & Kaufmann, 2022 ; Seifert et al., 2017). Leurs modes de dispersion seraient également différents : tandis que *T. magnum* et *T. darioi* auraient une dispersion assistée par l'homme, *T. nigerrimum* se disperserait par le vol.

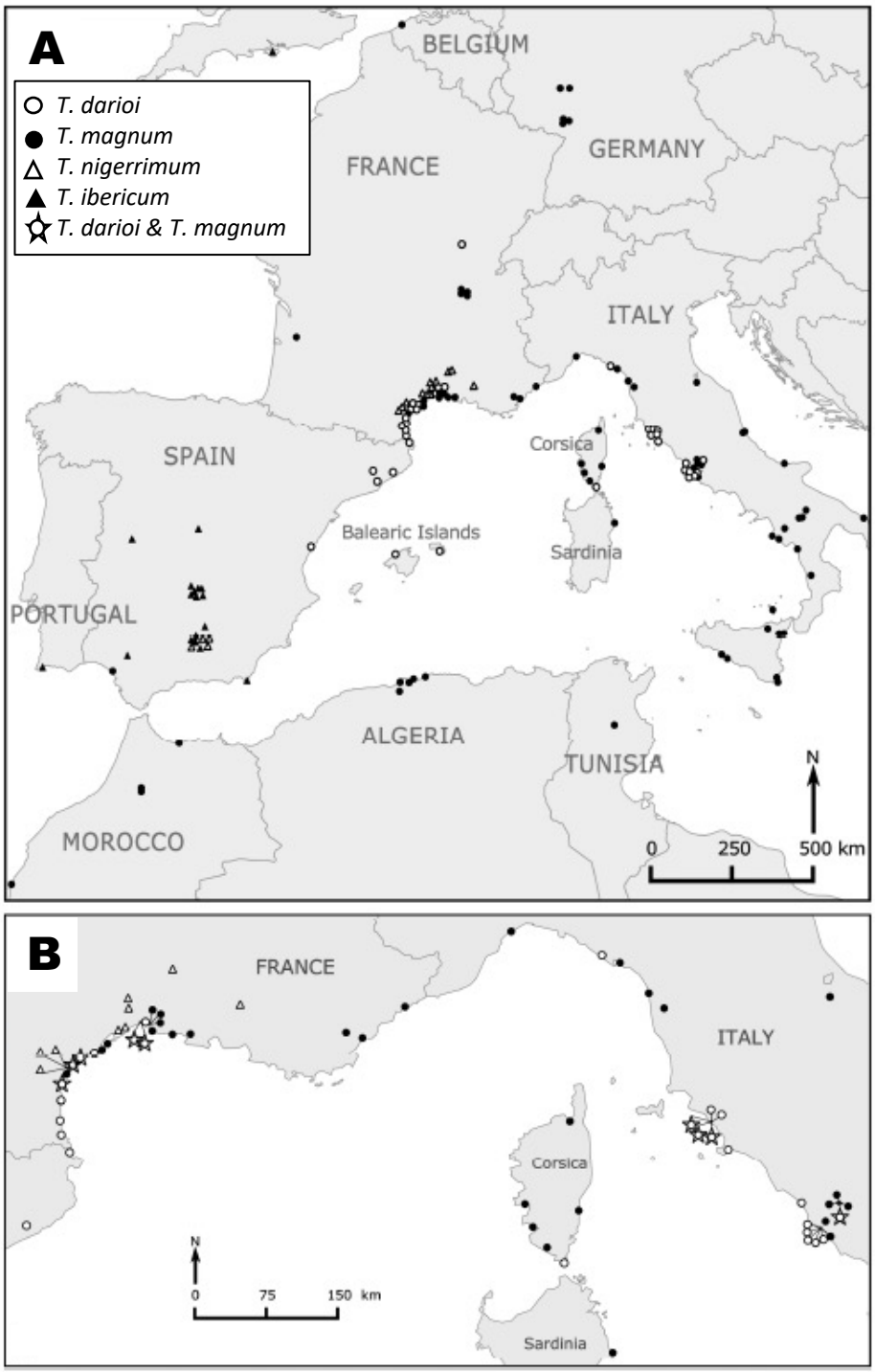


Figure 13 : A) Carte représentant les sites où les espèces du complexe *Tapinoma nigerrimum* ont été observées. B) Focus sur le littoral français méditerranéen et sur une partie de l'Italie. Disques blancs : *T. darioi*, disques noirs : *T. magnum*, triangles blancs : *T. nigerrimum sstr.*, triangles noirs : *T. ibericum,* étoiles : *T. darioi* et *T. magnum* (Seifert et al., 2017).



Figure 14 : Les supercolonies de l'espèce invasive *Tapinoma darioi* forment un réseau dense de nids, dont chacun est polygyne et très peuplé. La photo illustre l'activité typique des nids de ces fourmis dans un parc urbain à Montpellier, ici au bassin Jacques Cœur. Photos : Alan Vergnes.

Les fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* ont un régime alimentaire généraliste (Blatrix et al., 2013). Elles se nourrissent principalement de miellat produit par des hémiptères et d'invertébrés vivants ou morts et consomment également divers détritus comme des fruits pourris (Figure 15).

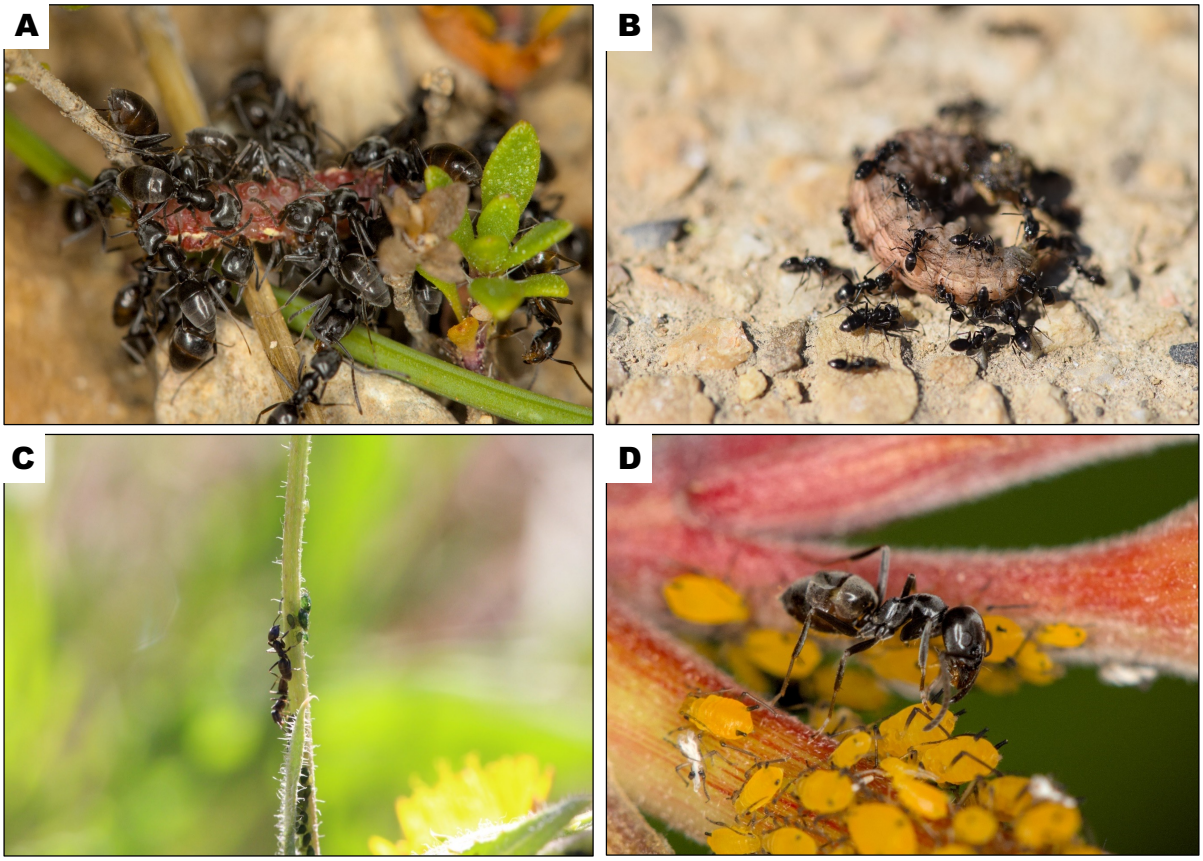


Figure 15 : Photos illustrant les fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* et leur régime alimentaire. A) Une larve prise au piège par un groupe de fourmis probablement *Tapinoma nigerrimum*. Photo prise sur la montagne de l'Hortus, en garrigue. Photo : Rumsais Blatrix. B) Petit groupe d'ouvrières appartenant à une supercolonie de *Tapinoma darioi* attaquant une chenille. Photo prise dans un parc urbain de Montpellier. Photo : Julia Centanni. C) Le miellat des pucerons constitue une grande partie du régime alimentaire des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum*. Ouvrières de fourmis du groupe *Tapinoma nigerrimum* sur une plante en interaction avec des pucerons verts dans un espace vert urbain à Montpellier. Photo : Yannick Juvé. D) Ouvrière d'une des espèces invasives du groupe *Tapinoma nigerrimum* collectant du miellat de pucerons, probablement *Aphis nerii*, sur un laurier-rose en Corse. Photo : Rumsais Blatrix.

Les espèces invasives du complexe *Tapinoma nigerrimum* présentent des problèmes émergents, tels que, des dégâts chez les agriculteurs à travers le mutualisme qu'elles entretiennent avec les pucerons ainsi que des nuisances dans les jardins par leur abondance et par leurs morsures sur les usagers. Ces dégâts sont encore peu documentés même s'ils commencent à être médiatisés[2345] (Seifert et al., 2017).

[2] https://www.sudouest.fr/environnement/animaux/tapinoma-une-nouvelle-fourmi-envahissante-arrive-dans-le-sud-ouest-3029840.php

[3] https://france3-regions.francetvinfo.fr/corse/haute-corse/balagne/tapinoma-magnum-invasion-fourmis-menace-biodiversite-jardins-potagers-maisons-corse-1835634.html

[4] https://www.tf1info.fr/environnement-ecologie/video-fourmis-envahisseuses-que-sait-on-des-tapinoma-magnum-qui-colonisent-de-plus-en-plus-de-jardins-2219934.html

[5] https://www.letelegramme.fr/soir/quelle-est-cette-super-fourmi-qui-pourrait-en-pincer-pour-la-bretagne-09-05-2022-13019650.php

5. Aire d'étude : Montpellier et ses environs

La zone d'étude de 60 × 25 km est localisée en région méditerranéenne et centrée sur la ville de Montpellier (Figure 23), elle est à cheval sur deux départements : l'Hérault et le Gard, située en région Occitanie. Cette zone géographique, proche de la côte méditerranéenne, associée à un climat doux et humide en hiver et sec et chaud en été (Climate-Data, 2021), présente une richesse faunistique et floristique importante qu'on nomme « hot-spots » ou points chauds de biodiversité (Médail & Quezél, 1999 ; Myers et al., 2000). Ces zones sont aussi considérées comme les plus menacées. Cette région représente donc un enjeu de conservation de biodiversité (Myers et al., 2000). L'Hérault est particulièrement riche en insectes et spécialement en fourmis. On peut d'ailleurs observer sur la carte que plus de 80 % d'espèces de fourmis y sont retrouvées (Figure 16).

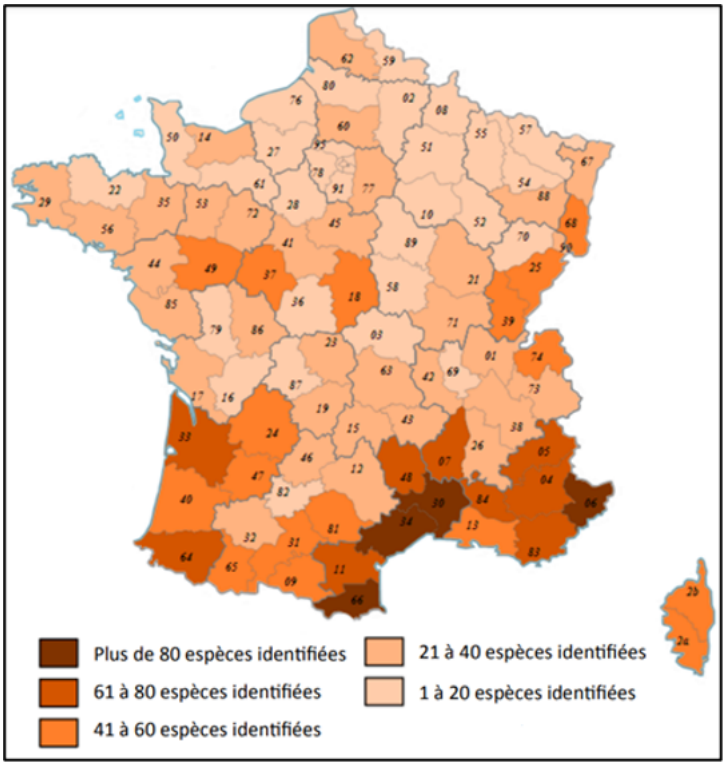


Figure 16 : Carte représentant le nombre d'espèces de fourmis en France par département (INPN, 2014).

La zone d'étude est centrée sur la ville de Montpellier et forme une diagonale sud-ouest / nord-est depuis l'étang de Thau jusqu'à Nîmes, ville limitrophe dans le Gard. Les secteurs les plus éloignés du littoral sont à environ 20 km à l'intérieur des terres. Cette zone a été sélectionnée car trois des quatre espèces du complexe (*T. darioi*, *T. magnum* et *T. nigerrimum*) y ont été observées (Seifert et al., 2017). L'aire urbaine de Montpellier est constituée d'un ensemble de communes qui se trouvent au centre d'un réseau dense de communication entre de grandes villes proches, comme Nîmes, Lunel et Sète (INSEE, 2016).
La géographie de notre aire d'étude permet de distinguer 3 zones distinctes présentant des occupations du sol contrastées avec une juxtaposition de zones naturelles, urbaines et agricoles (DREAL, 2015), avec des caractéristiques de sols très variables telles que leur

ancienneté, la texture, la richesse en matière organique, l'imperméabilité. Le territoire est constitué d'un gradient d'habitats avec, au Nord, des zones plus naturelles comme les garrigues, traversée par des cours d'eau qui ont sculpté de nombreuses petites vallées. Le centre est occupé par la plaine urbaine et agricole, segmentée par la zone urbaine de Montpellier. Cette plaine, mosaïque agricole, est traversée par des fleuves jusqu'à la mer. Au Sud, un cordon dunaire longe la mer et les étangs littoraux (SCOT, 2006 ; SCOT, 2019).

Nouvelle ville du Xème siècle, Montpellier est marquée par la création des premières universités d'Europe et sera la seconde ville la plus peuplée du royaume de France au cours du XIIème siècle. Les XVIIème et XVIIIème siècles s'accompagneront d'une phase de développement intense. Jusque dans la période d'après-guerre, Montpellier restera cependant une ville de province universitaire et administrative (SCOT, 2019).

A partir des années 60 Montpellier connait un essor spectaculaire au niveau économique, touristique et démographique (Figure 17). L'étalement urbain touche particulièrement les anciennes terres viticoles de l'ouest et du sud de la ville. Montpellier est une ville novatrice en évolution permanente et ses principes de développement durable font qu'elle est, entre autres, de plus en plus végétalisée (INSEE & SOeS, 2009). Cependant, dans un contexte de croissance démographique soutenue, la Métropole de Montpellier vise à étendre son urbanisation et son réseau de communication vers la mer (SCOT, 2019). Le port de Sète, situé à proximité, est un lieu d'échanges intéressant pour le commerce international (INSEE & SOeS, 2009), ce qui représente également des points d'entrées pour de nombreuses espèces. Par exemple, le Séneçon du Cap *sénecio inaequidens,* originaire d'Afrique du Sud, est une plante toxique qui envahit les prairies en France et dont les graines ont été transportées par le commerce de laine de moutons à destination des ports de Marseille et de Sète (Costa, 2005).

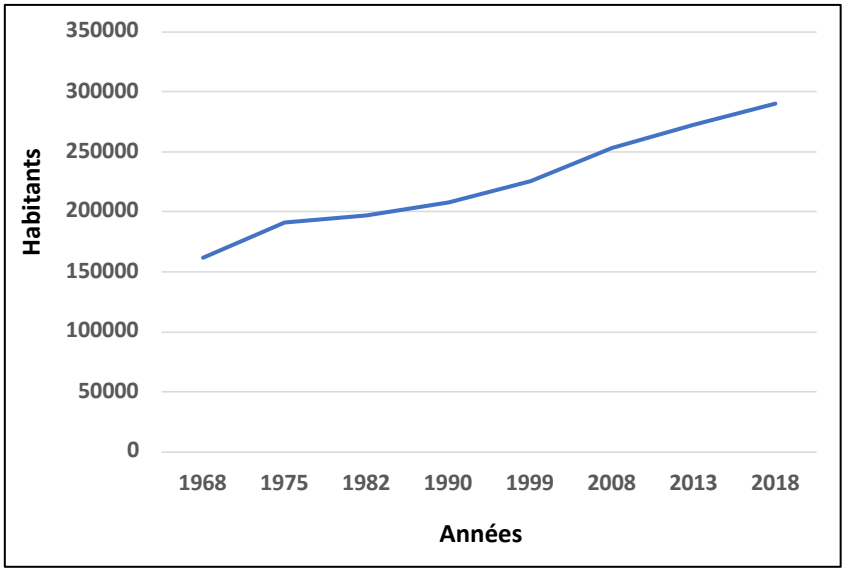


Figure 17 : Évolution de la population de Montpellier de 1962 à 2020 (données INSEE, 2022).

La superficie urbanisée de l'Occitanie a triplé au cours des 60 dernières années, avec plus de 100 000 hectares urbanisés et sa population a doublé (DREAL, 2015). Montpellier, Nîmes et Perpignan regroupent 20 % de la population régionale (DREAL, 2015). Montpellier fait partie des métropoles françaises les plus dynamiques sur le plan démographique (SCOT, 2006). En 2018, elle comptait près de 290 053 habitants, soit une densité de population moyenne de 5 099 habitants/km² (INSEE, 2022). La croissance démographique de la population de la Métropole de Montpellier a légèrement diminué au cours du temps mais reste haute par rapport aux autres Métropoles : elle est passée de + 1,5 % par an en moyenne entre 1999 et 2006 à + 1 % entre 2006 et 2011 (Figure 18) (INSEE, 2016).

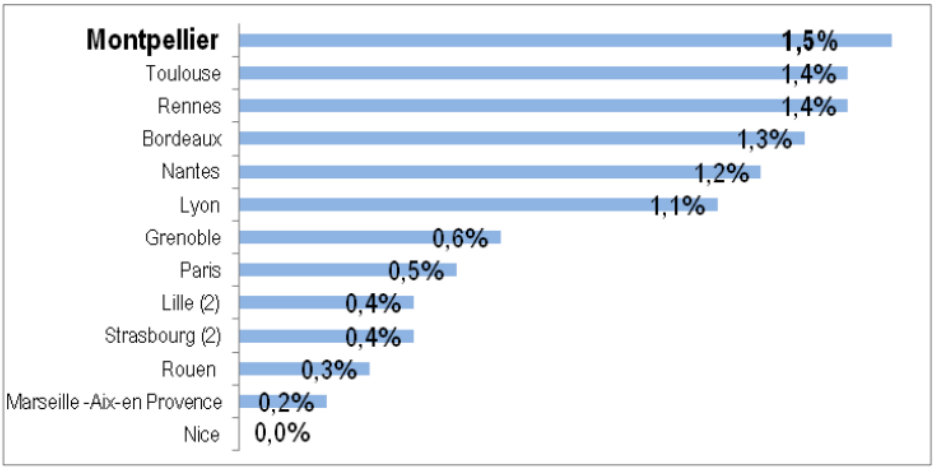


Figure 18 : Graphique illustrant le taux de croissance annuelle de la population en 2008-2013 des principales aires urbaines françaises (SCOT, 2019).

Au vu des estimations d'arrivées de nouvelles populations, la ville s'expose à une amplification des voies de communications (saturation des axes routiers), engendrant une accentuation de la pollution (DREAL, 2015) et une forte perturbation des sols et donc de la biodiversité qu'ils hébergent.

La zone sélectionnée est marquée par une urbanisation croissante (Figure 19) (Moriconi-Ebrard, 2016), elle est donc adaptée à l'étude des impacts de l'urbanisation. L'urbanisation de cette zone offre des niches vides ou de nouveaux habitats, avec une diminution des prédateurs et de nouvelles ressources alimentaires, qui peuvent convenir à certaines espèces adaptées à ces conditions particulières qui pourraient alors se développer (Cadotte et al., 2017). La coexistence, sur le territoire du grand Montpellier (France méditerranéenne), d'espèces de fourmis étroitement apparentées mais présentant des caractères invasifs très contrastés est une opportunité scientifique puisqu'elle va permettre de développer une approche comparative *in situ* dans un contexte local marqué par une très forte dynamique d'urbanisation (Moriconi-Ebrard, 2016).

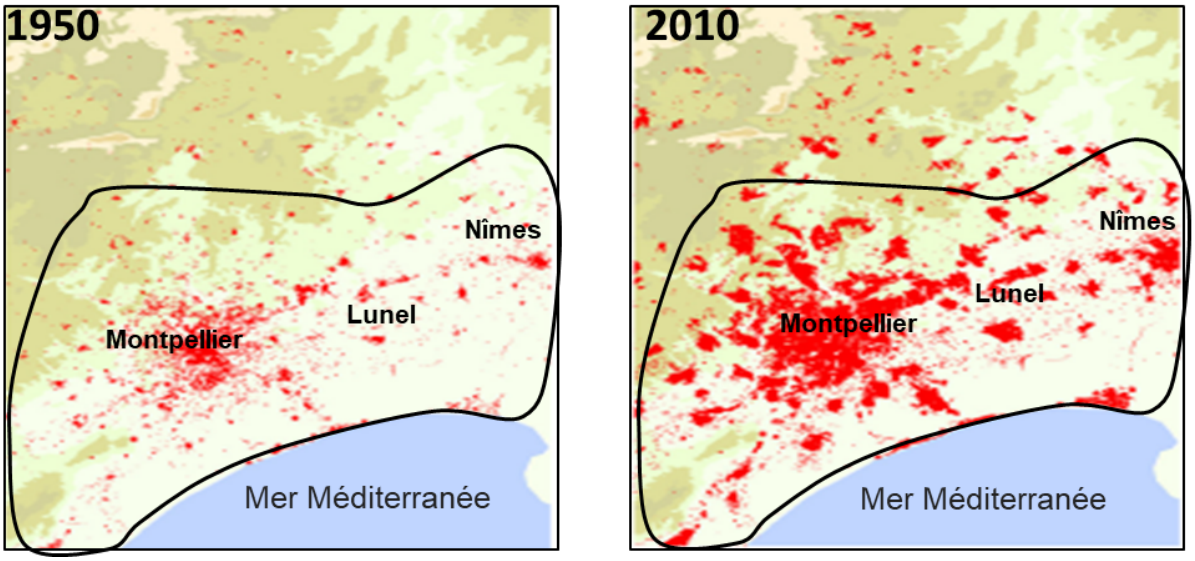


Figure 19 : Cartes représentant l'évolution de l'urbanisation de 1950 à 2010 au niveau de Montpellier et de ses environs. Les milieux urbains sont représentés en rouge et le trait noir correspond à la délimitation de la zone d'étude. Source : IGN, DREAL, Languedoc-Roussillon (DREAL, 2015).

6. Plan et objectifs de la thèse

Malgré les impacts des fourmis invasives, les paramètres environnementaux favorables au caractère invasif restent donc mal connus (Kenis et al., 2009) il est donc nécessaire d'améliorer notre compréhension des mécanismes qui peuvent favoriser certaines espèces en contexte urbain (Cadotte et al., 2017). La coexistence, sur un territoire de taille réduite, de plusieurs espèces apparentées connues pour avoir des sensibilités différentes vis-à-vis de l'urbanisation offre un contexte d'étude très propice. En effet, dans notre zone d'étude, trois espèces du complexe *Tapinoma nigerrimum* ont été observées ; *T. darioi* et *T. magnum* et *T. nigerrimum*.

Ainsi, les objectifs de cette thèse seront d'évaluer l'effet de l'urbanisation sur la présence des espèces de fourmis de ce complexe et sur sa structuration génétique. Nous cherchons à savoir comment ces trois espèces se partagent l'espace localement, si elles sont influencées par l'urbanisation et quelle espèce prédomine dans cette zone. Nous souhaitons également analyser si leur présence a un effet et quel est-il sur les communautés de fourmis.

Nous traiterons cette problématique en 3 chapitres et selon le plan suivant :

- Dans le premier chapitre, nous étudierons les effets de l'urbanisation sur la distribution des différentes espèces du complexe à l'échelle du paysage selon un gradient d'urbanisation. Pour cela, nous établirons un échantillonnage systématique des colonies de *Tapinoma* dans et autour de Montpellier. La zone étudiée, s'étendant jusqu'à 20km de la côte, est caractérisée par une mosaïque de paysages (zones

urbaines, naturelles et agricoles). Compte tenu de la difficulté à différencier les espèces morphologiquement, l'identification reposera sur l'utilisation de marqueurs génétiques. Ce travail complètera et affinera l'étude de Seifert et al. (2017) réalisée à une échelle européenne.

- Dans un deuxième chapitre, nous caractériserons la structuration populationnelle, au sein de cette même diversité de paysages, de trois espèces vivant en sympatrie mais présentant des préférences d'habitat et des modes de dispersion différents : *T. nigerrimum*, *T. darioi* et *T. madeirense*. La mise en évidence de la structuration génétique des populations permettra de mieux comprendre les liens entre les populations et de proposer des hypothèses quant à l'effet du paysage.

- Dans un troisième et dernier chapitre nous évaluerons les effets de la présence de *T. darioi* sur les communautés de fourmis présentes dans les espaces verts de la ville de Montpellier.

Enfin nous terminerons par une synthèse générale, offrant une rétrospective du travail accompli et les perspectives qui en émergent.

CHAPITRE 1

Effet de l'urbanisation et cartographie des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* sur le territoire du grand Montpellier

1. RÉSUMÉ

• Introduction

Afin de mieux comprendre les interactions entre l'urbanisation et les traits des espèces nous avons comparé des espèces phylogénétiquement proches qui coexistent dans un paysage urbanisé. Notre étude analyse donc la distribution des espèces de fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* dans une ville du sud de la France, à Montpellier et ses environs, où les trois espèces sont trouvées.

Ces espèces diffèrent au niveau de leurs traits : *Tapinoma nigerrimum* forme des colonies monodomes et ne présente pas de caractéristiques d'espèces vagabondes. *Tapinoma ibericum* est observée majoritairement en Espagne. Et enfin *Tapinoma darioi* et *T. magnum* présentent des traits d'espèces vagabondes et se répandent dans le Sud de la France (Berville et al., 2013 ; Blight et al., 2010) ainsi que dans plusieurs villes d'Europe en dehors de leur aire d'origine (Dekoninck et al., 2015 ; Seifert et al., 2017).

Dans ce contexte nous nous attendons à observer *Tapinoma darioi* et *T. magnum* en milieu urbain tandis que *T. nigerrimum* devrait être plus commune dans les habitats naturels (Seifert et al., 2017). Nous faisons l'hypothèse d'une relation positive entre le niveau d'urbanisation et l'occurrence de *Tapinoma darioi* et *T. magnum*.

Pour caractériser la distribution des différentes espèces au sein des habitats, compte tenu de la difficulté à distinguer morphologiquement les trois espèces, nous avons employé des marqueurs microsatellites. Ces marqueurs ont également permis d'identifier des espèces n'appartenant pas au complexe mais que l'on peut rencontrer dans la région méditerranéenne comme *Tapinoma erraticum* et *Tapinoma madeirense* (Blatrix et al., 2013). Une cartographie de la distribution de chacune des espèces a été réalisée et nous avons lié leurs occurrences au niveau d'urbanisation calculé par les proportions de classe de couverture du sol (imperméable, agricole et naturelle).

• Matériels et Méthodes

▪ Site d'étude et échantillonnage

Notre zone d'étude, centrée sur Montpellier, est composée d'une variété d'occupations des sols : 38,95% des points sont répartis dans les zones urbaines, 30,99% dans les zones naturelles et 30,05% dans les zones à usage agricole (Figures 20 et 21).



Figure 20 : Exemples de paysages naturels que l'on peut rencontrer aux alentours de Montpellier allant de la garrigue, aux dunes de sables. A) Dunes de sables, proche de Carnon, station balnéaire de l'Hérault à proximité de Montpellier. B) Zone boisée aux alentours de Montpellier. C) Garrigue au nord de Montpellier. D) Garrigue à proximité d'une rivière. E) Localisation des quatre exemples de paysages naturels cités aux alentours de Montpellier. Carte réalisée sur Google Maps. Photos : Julia Centanni.



Figure 21 : Exemples de paysages agricoles et urbains de la zone d'étude. A) Photo d'un paysage agricole (vignoble). B) Photo de parking à proximité d'un port. C) Quartier résidentiel. D) Parking au niveau du littoral. E) Localisation des quatre paysages agricoles et urbains cités aux alentours de Montpellier. Carte réalisée sur Google Maps. Photos : Julia Centanni.

L'échantillonnage a été réalisé de mars à juillet 2019, par temps sec, entre 15°C et 30°C (période d'activité maximale pour la majorité des fourmis) sur les 926 points qui ont été disposés aléatoirement à l'aide du logiciel QGIS sur une grille avec des mailles de 1 km² (Figure 23). L'échantillonnage a été effectué dans un rayon de 15m autour de chaque point (Gippet et al., 2017) et le long de quatre transects de 50m (orientés Nord, Sud, Est, Ouest), par des équipes de deux personnes qui ont réalisé une recherche directe des nids de *Tapinoma*, pendant une vingtaine de minutes maximum, suivie d'une collecte manuelle avec un aspirateur à insectes (Figure 22). 30 individus ont pu être collectés dans chaque nid repéré et conservés dans l'éthanol à 96%.



Figure 22 : Photos illustrant l'utilisation de l'aspirateur à insectes sur le terrain. A) Prélèvement de *Tapinoma* sur un trottoir. B) Prélèvement de *Tapinoma* au niveau d'une fissure dans la chaussée. C) Transfert des individus dans des tubes contenant de l'alcool à 96%. Photos : Julia Centanni.

Toutes les fourmis du genre *Tapinoma* ont été prélevées et identifiées par analyses génétiques. Seifert et al. (2017) se sont basés sur des méthodes morphologiques NUMOBAT et ont également utilisé le séquençage de l'ADN mitochondrial (gène de la cytochrome oxydase). Cependant, ces méthodes ont fait apparaître un certain nombre de désaccords entre NUMOBAT et l'ADNmt chez *T. magnum* et *T. darioi*. C'est pourquoi nous avons utilisé une troisième technique, alternative, pour identifier les individus collectés : nous avons suivi les méthodes développées dans Cordonnier et al. (2019), en utilisant 15 marqueurs microsatellites.

- **Analyses génétiques**

Nous avons donc procédé à l'extraction de l'ADN d'un individu par colonie, les amorces ont ensuite été insérées permettant de détecter les microsatellites qui ont été amplifiés par PCR. Les échantillons ont ensuite été envoyés à un prestataire (GENTYANE, Clermont-Ferrand). Trois méthodes ont été utilisées pour identifier les espèces : ACP simple, ACP discriminante (dACP, Jombart, 2008 ; Jombart et al., 2010) et GENECLASS 2 (Piry et al., 2004). Les résultats d'identification ont été utilisés dans l'analyse bayésienne (STRUCTURE, Pritchard et al., 2000) pour confirmation.

- **Analyses spatiales**

Les analyses spatiales ont été réalisées sur la base de données d'occupation de sol 2015 de l'OCS GE (Occupation du sol à Grande Échelle) Version 1.1 pour les départements de l'Hérault et du Gard de l'IGN (Institut national de l'information géographique et forestière). Les pourcentages d'urbanisation, d'usage agricole et de zones naturelles ont été calculés dans une zone tampon de 250 m de rayon autour de chaque point échantillonné. Nous avons également mesuré la distance à la côte.

- **Analyses statistiques**

A l'aide des données obtenues nous avons appliqué des modèles linéaires généralisés (GLM) avec erreur logistique binomiale (également appelés modèles logistiques) afin d'étudier la probabilité d'occurrence des espèces détectées en fonction du pourcentage d'urbanisation, d'usage agricole et de zones naturelles, de la distance à la côte et de l'interaction entre le pourcentage urbain et la distance à la côte. Trois types de modèles (linéaire, quadratique et cubique) ont été testés car les paramètres environnementaux pouvaient présenter des réponses plus complexes que linaires, avec des seuils (Crawley, 2009 ; McDonnell & Hahs, 2008). Les meilleurs modèles ont été choisis selon les critères d'Akaike (AIC).

• Résultats

373 colonies de *Tapinoma* ont été échantillonnées sur les 926 points prospectés. Les résultats des analyses génétiques ont permis d'identifier 197 individus de *T. nigerrimum*, 78 *T. darioi*, 6 *T. magnum*, 1 *T. ibericum* et 91 *T. madeirense* (Figure 23). Nous n'avons pas détecté de *Tapinoma* dans les 553 points restants. *Tapinoma magnum* et *T. ibericum* étant peu collectées, elles n'ont donc pas été incluses dans les analyses statistiques.

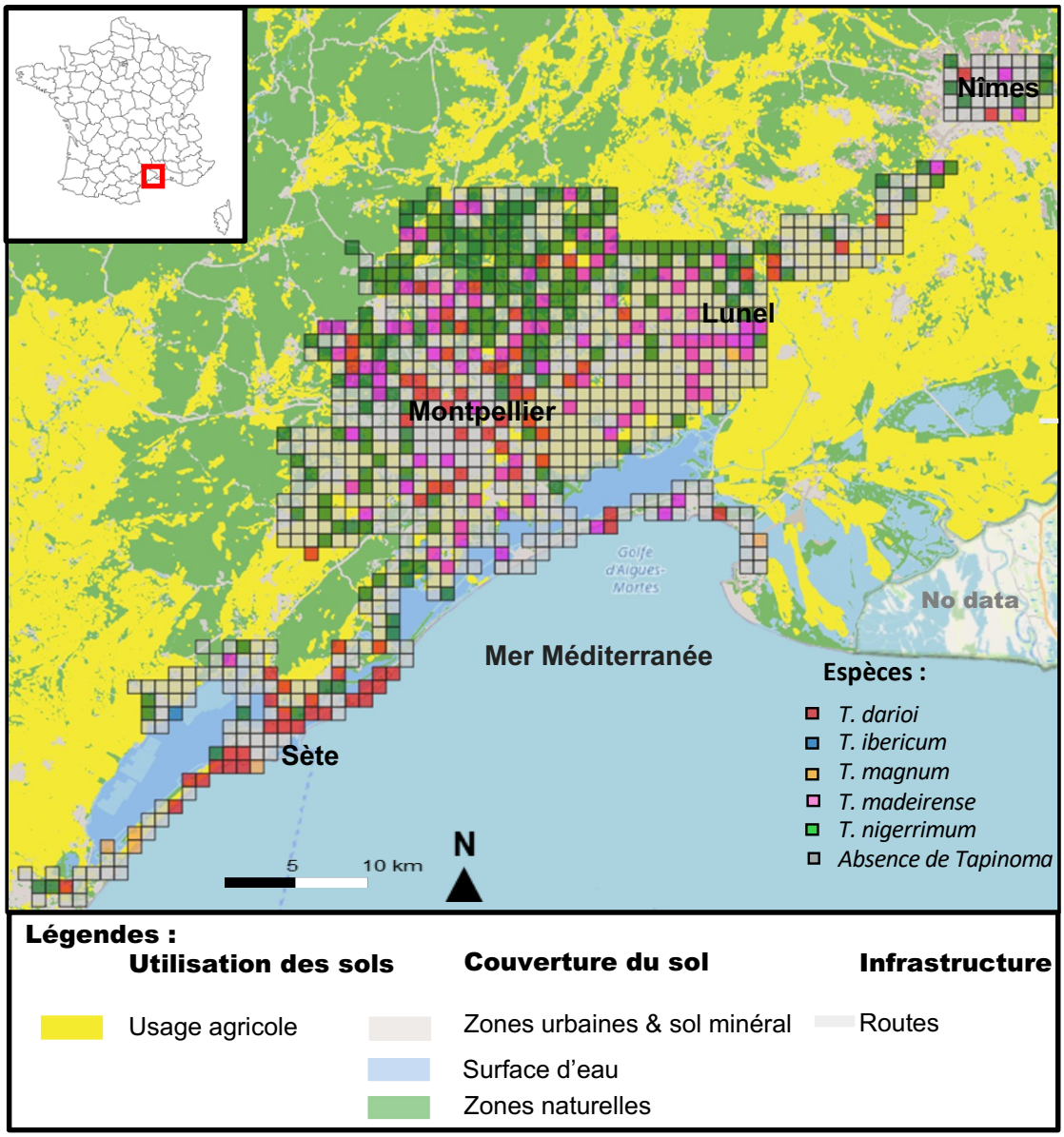


Figure 23 : Carte représentant la grille d'échantillonnage avec ses mailles colorées en fonction de l'espèce rencontrée.

Notre intérêt porte ici uniquement sur le complexe *Tapinoma nigerrimum* malgré l'abondance constatée de *T. madeirense* qui ne fait pas partie du complexe. Une majorité de colonies de *Tapinoma nigerrimum* a été observée dans les zones « naturelles ». Les GLMs ont montré un effet positif significatif du pourcentage de zones naturelles sur la probabilité d'occurrence de cette espèce (Figure 24). A l'inverse, pour *T. darioi*, les GLMs ont montré un effet négatif significatif du pourcentage de zones naturelles (Figure 24). Dans les deux cas, les meilleurs modèles selon l'AIC ont été les modèles linéaires.

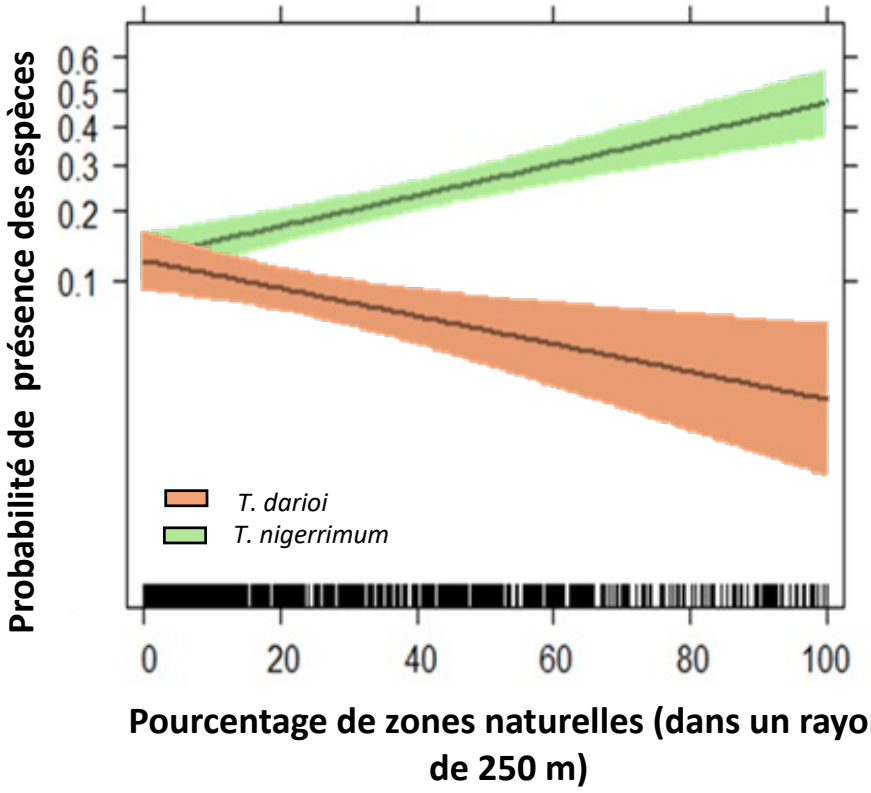


Figure 24 : Probabilités d'occurrence de *Tapinoma nigerrimum* (en vert, modèle linéaire, valeur p < 0,001) et *Tapinoma darioi* (en orange, modèle linéaire, valeur p < 0,001) en fonction du pourcentage de zones naturelles dans un tampon circulaire de 250 m de rayon autour des sites d'échantillonnage.

Dans les zones urbaines, 38 colonies de *Tapinoma nigerrimum*, 37 colonies de *T. darioi*, 26 colonies de *T. madeirense*, 1 colonie de *T. magnum* et 1 colonie de *T. ibericum* ont été détectées. Pour *T. nigerrimum*, le meilleur modèle sélectionné est le modèle cubique (Figure 25) avec une probabilité d'occurrence très élevée de 0 à 20% d'urbanisation, suivie d'un plateau de 20 à 70% et d'une chute au-delà de 70%. Pour *T. darioi*, le meilleur modèle selon l'AIC traduit un effet quadratique (Figure 25) : les probabilités d'occurrence sont maximales autour de 60% d'urbanisation (Figure 25).

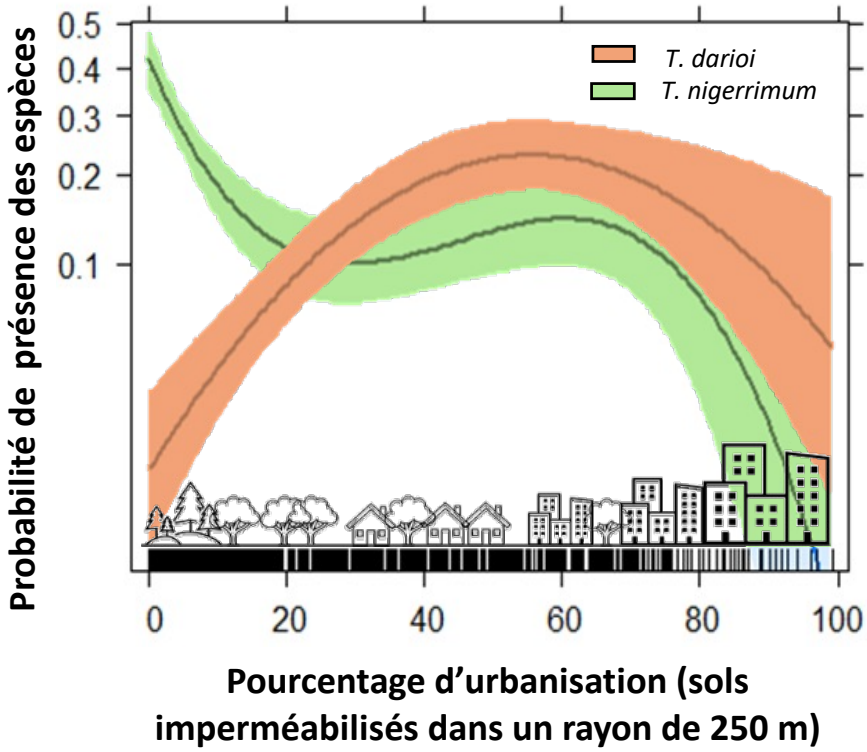


Figure 25 : Probabilités d'occurrence de *Tapinoma nigerrimum* (en vert, modèle cubique, valeur p < 0,001) et de *T. darioi* (en orange, modèle quadratique, valeur p < 0,001), en fonction du pourcentage d'urbanisation dans un tampon circulaire de 250 m de rayon autour des sites d'échantillonnage.

Dans les zones agricoles, 58 colonies de *Tapinoma nigerrimum*, 23 colonies de *T. madeirense* et 7 colonies de *T. darioi* ont été détectées. Pour *T. nigerrimum*, le meilleur modèle est le modèle quadratique avec une probabilité d'occurrence maximale pour environ 50% d'usage agricole (Figure 26). Pour *Tapinoma darioi*, les GLMs ont montré un effet négatif du pourcentage d'usage agricole (Figure 26). Le meilleur modèle est le modèle linéaire.

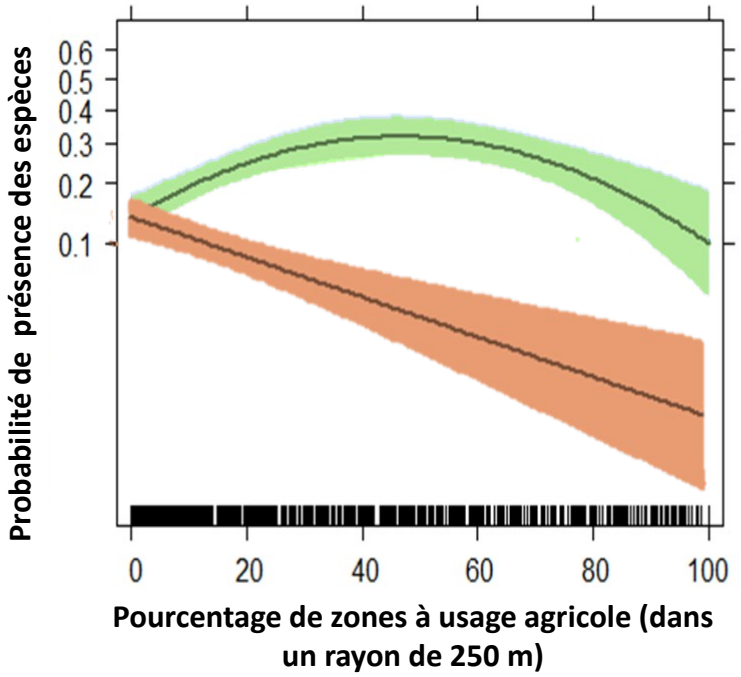


Figure 26 : Probabilités d'occurrence de *Tapinoma nigerrimum* (en vert, modèle quadratique, valeur p < 0,001) et de *T. darioi* (en orange, modèle linéaire, valeur p < 0,001), en fonction du pourcentage d'urbanisation dans un tampon circulaire de 250 m de rayon autour des sites d'échantillonnage.

La probabilité d'occurrence de *Tapinoma nigerrimum* est positivement et linéairement corrélée avec la distance à la côte, à l'inverse de celle de *T. darioi* qui diminue linéairement en s'éloignant de la côte (Figure 27).

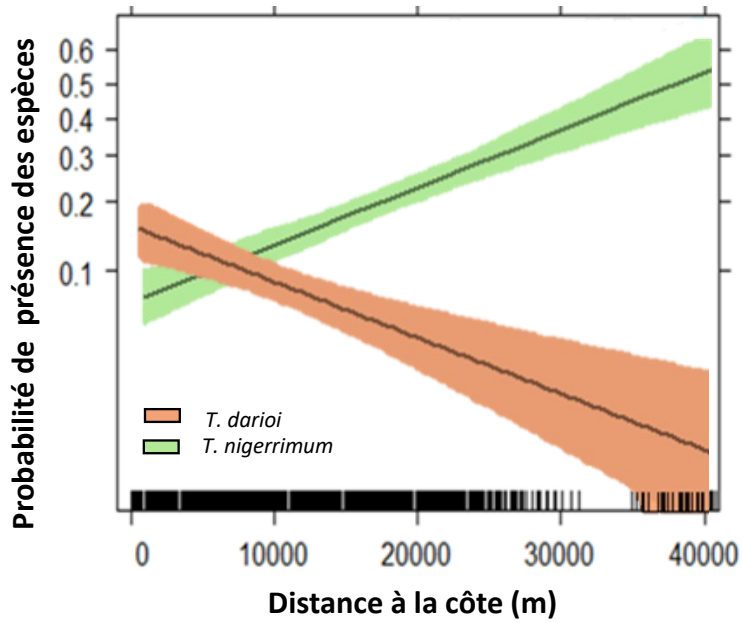


Figure 27 : Probabilités d'occurrence de *Tapinoma nigerrimum* (en vert, p < 0,001) et de *T. darioi* (en orange, p < 0,001), en fonction de la distance à la côte en mètres.

- **Discussion**

L'espèce la plus fréquemment observée dans notre zone d'étude est *Tapinoma nigerrimum*, elle a été retrouvée dans 21% des points échantillonnés, par rapport à *T. darioi* (8%), *T. magnum* (1%) et *T. ibericum* (1 site). Cela est cohérent car *Tapinoma nigerrimum* est en effet considérée comme une espèce assez commune dans le sud de la France (Blatrix et al., 2013 ; Seifert et al., 2017). Nous pouvons comparer nos résultats à ceux de Gippet et al. (2017) obtenus pour le genre *Lasius* à Lyon où les espèces locales non invasives sont plus communes que l'espèce exotique invasive, *Lasius neglectus,* originaire d'Asie : *Lasius niger*, *L. alienus* et *L. emarginatus* y ont été observés dans respectivement 74,9 %, 21 % et 16 % des points échantillonnés, tandis que *L. neglectus* a montré une prévalence plus faible de 5 %. Gippet et al. (2017) considèrent cependant ce nombre d'occurrences important au regard de la taille de la zone étudiée (zone urbaine de Lyon, en France). A titre de comparaison, 47 occurrences de *L. neglectus* étaient connues en France et 174 occurrences pour toute l'Europe (Espadaler & Bernal, 2015).

La faible présence de *Tapinoma magnum* n'était pas attendue dans notre zone d'étude, car Seifert et al. (2017) l'ont observé le long de la côte méditerranéenne presque aussi souvent que *T. darioi*. Afin de mieux comprendre les causes de cette différence, des études complémentaires pourraient être envisagées comme des expériences de compétitions entre les deux espèces ou encore la détermination des voies d'invasions. *Tapinoma ibericum* n'a été observée qu'une fois, ce qui était attendu. D'après les observations de Seifert et al. (2017) elle est en effet majoritairement rencontrée en Espagne. C'est la première citation de cette espèce dans le sud de la France.

Seifert et al. (2017) avaient suggéré que *Tapinoma darioi* était plus abondante dans les sites impactés par les activités humaines à l'inverse de *T. nigerrimum* qui préfère les habitats naturels. En effet, *T. nigerrimum* était très présente dans les zones naturelles à l'inverse de l'espèce vagabonde *T. darioi* qui a atteint un pic à des niveaux intermédiaires d'urbanisation. Ces résultats soutiennent notre hypothèse d'une relation positive entre l'urbanisation et l'occurrence d'espèces qui présentent des traits communs aux fourmis invasives.

Pour expliquer ces distributions différentes, plusieurs hypothèses sont proposées. Cette distribution pourrait s'expliquer par une présence historique dans la zone d'étude avant l'expansion de la ville. En effet*, Tapinoma darioi*, trouvée dans les habitats sableux le long de la côte, comme l'arrière des dunes de sable proches de la mer (Seifert et al., 2017), pourrait s'être propagée ou également avoir été introduite dans les zones urbaines par les activités humaines contrairement aux espèces locales (Cadotte et al., 2017). Enfin, à l'inverse de *T. nigerrimum*, la dispersion de *T. darioi* serait probablement due à l'homme étant donné ses caractéristiques d'espèce vagabondes (Seifert et al., 2017) comme c'est le cas chez de nombreuses espèces invasives (King et al., 2009 ; Suarez et al., 2001). En plus de son potentiel déplacement par les échanges et notamment par le transport de plantes (Seifert et

al., 2017), on peut émettre l'hypothèse que si *T. darioi* préfère les habitats minéraux que le transfert de sable et de remblais peut alors, aussi jouer un rôle dans sa dispersion.

Les niveaux intermédiaires d'urbanisation qui correspondent aux banlieues vertes, aux parcs urbains des villes, offrent un environnement hétérogène (Cadenasso et al., 2007 ; Clergeau, 2007 ; McKinney, 2006) et pourraient fournir des parcelles d'habitat pour des espèces invasives telles que *Tapinoma darioi*. *Tapinoma nigerrimum* ne présente pas les caractéristiques d'espèce vagabonde (Passera, 1994), elle est monodomique (Seifert et al., 2017). Inversement, l'organisation supercoloniale de *T. darioi* pourrait faciliter l'accès à de nombreux sites de nidification dans le paysage hétérogène des banlieues, comme cela a été observé chez la fourmi d'Argentine ou chez *Tapinoma sessile* (Heller & Gordon, 2006 ; Menke et al., 2010).

L'absence de sites de nidification appropriés et de ressources alimentaires dans les centres urbains denses pourrait expliquer le fait que *Tapinoma darioi* y soit peu présente. *Tapinoma darioi* a également pu s'installer dans des habitats perturbés où la compétition interspécifique est moins importante (Cadotte et al., 2017). En effet, dans les parties plus denses du gradient urbain des concurrents potentiels peuvent être présents comme *Tetramorium immigrans*, *Lasius niger* ou *Pheidole pallidula* (Madre et al., 2013).

Tapinoma darioi pourrait être mieux adaptée que *T. nigerrimum* aux températures plus élevées des zones urbaines ou aux milieux des dunes proches de la côte. En effet, des espèces de fourmis étroitement apparentées peuvent différer dans leur tolérance thermique (Cerdá et al., 1989). Angilletta et al. (2007) ont montré que les taxons ectothermes comme les fourmis des zones urbaines seraient plus tolérants à la chaleur que ceux des zones rurales.

En conclusion, cette étude a permis d'améliorer nos connaissances sur la distribution de ces espèces dans un paysage urbain. L'urbanisation offre des habitats supplémentaires à *Tapinoma darioi* qui ne sont pas favorables à *T. nigerrimum* qui recherche des milieux plus végétalisés. L'étude de l'impact de l'urbanisation sur la structuration génétique entre les colonies de mêmes espèces récoltées dans ce paysage serait ensuite intéressante à mener.

***

Le travail qui suit présente les données détaillées, il a été publié dans Myrmecological News, en 2022. La version en ligne est disponible ici :

https://www.biotaxa.org/mn/article/view/73789

2. High resolution mapping in Southern France reveals distributions of supercolonial and monodomous species in the *Tapinoma nigerrimum* complex (Hymenoptera: Formicidae) are related to sensitivity to urbanization

Julia CENTANNI, Bernard KAUFMANN, Rumsais BLATRIX, Olivier BLIGHT, Adeline DUMET, Pierre JAY-ROBERT, Alan VERGNES

Publié dans le journal Myrmecological News en février 2022

doi: 10.25849/myrmecol.news_032:041

Address(es) of author(s)

Julia Centanni (contact author), Rumsais Blatrix, Pierre Jay-Robert & Alan Vergnes, CEFE, Université Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Université Paul Valéry Montpellier 3, F-34199 Montpellier, France. E-mail: julia-jane.centanni@univ-montp3.fr

Bernard Kaufmann & Adeline Dumet, Université Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France.

Olivier Blight, Avignon Université, Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, IMBE, F-84000 Avignon, France.

Abstract

Urbanization modifies environments worldwide creating opportunities for the establishment of invasive species, natives or non-natives, a main driver of global change. To understand the process of biological invasion, we need to decipher the interactions between urbanization and species traits. Within the Mediterranean *Tapinoma nigerrimum* species complex (Hymenoptera, Formicidae), *Tapinoma darioi* Seifert, 2017 and *Tapinoma magnum* Mayr, 1861 have spread in continental European cities and exhibit “tramp”-species traits. In contrast, *T. nigerrimum* (Nylander, 1856) is not expanding its range and does not exhibit characteristics of tramp ant species. We investigated whether the distribution of these species differed in relation to land use. We chose Montpellier (Mediterranean France) as a study site because it combines the presence of all three species with rapid urbanization. Occurrence data were generated by systematically sampling all *Tapinoma* colonies over 926

sites, > 500 m away from one another, over a 60 × 25 km area. Species were identified using 15 microsatellite markers. Four land-cover classes (urbanization, agricultural, natural, water) were used for landscape analyses based on 250 m-radius buffer zones. *Tapinoma nigerrimum* was found at 197 sites (21.27% of occurrences), *T. darioi* on 78 sites (8.42%), and *T. magnum* on 6 sites (0.65%). The probability of occurrence of *T. darioi* was positively correlated with urbanization up to a threshold of 75% impervious land-cover, negatively correlated with natural land-cover, and was higher near the coast. In contrast, *T. nigerrimum* occurred less often at sites with impervious land-cover and near the coast, and more frequently in natural areas. These distinct distributions support an association between urbanization and species exhibiting tramp traits, and highlight the importance of adapting land management to control biological invasions.

Key words: *Tapinoma darioi,* urban landscape, Montpellier*, Tapinoma magnum*, Mediterranean region, microsatellite

Introduction

Urbanization is land conversion leading to total or partial irreversible soil replacement by impervious surfaces (e.g., buildings, roads, parking lots, large-scale infrastructures) (McKinney 2006). It has mainly negative consequences on native biodiversity (McKinney, 2002, 2006, Heterick et al., 2013, Cadotte et al., 2017), while creating opportunities for the establishment of some species which are adapted to disturbance caused by human activities (Vitousek et al., 1997, McKinney, 2006, Cadotte et al., 2017). As urban areas are hubs of human activities, they are also a main point of species entry, release or escape and spread (Padayachee et al., 2017).

According to Valéry et al., (2008, 2009), invasive traits, which allow species to spread to new areas or habitats and reach high numbers or densities, can be acquired by both indigenous and non-indigenous species. Successful biological invasions may result from interactions between urbanization and species' ecological traits (Cadotte et al., 2017). One way to investigate these interactions is to compare species that are closely related (i.e., that differ by only a few traits) and that co-occur spatially within an urbanized landscape (Cadotte et al., 2017). For example, a study of cryptic bat species showed that those two morphologically similar species may respond differently to urban landscapes (Lintott et al., 2016). One species is considered a generalist and tolerates moderate levels of urbanization (Hale et al., 2012, Lintott et al., 2016).

In the present study, we compared the distribution of cryptic ant species in the *Tapinoma nigerrimum* species complex (Hymenoptera, Formicidae) on a mosaic of land use. The *T. nigerrimum* species complex comprises four species found in the western Mediterranean region: *Tapinoma darioi* Seifert et al., 2017, *Tapinoma ibericum* Santschi, 1925, *Tapinoma magnum* Mayr, 1861, and *Tapinoma nigerrimum* (Nylander, 1856), the delineation of which has been clarified only recently (Seifert et al., 2017). Although similar morphologically, these

species have been separated by NUMOBAT (Numeric Morphology-Based Alpha-Taxonomy) and by mtDNA (mitochondrial DNA), and have different ecological traits (Seifert et al., 2017). All species are native to the Mediterranean region, but their precise native ranges need further investigations, except for *T. ibericum*, which is found in Southern Spain only, and *T. nigerrimum*, whose distribution is restricted to Spain and Southern France. *Tapinoma nigerrimum* forms monodomous colonies that are aggressive to one another (Seifert et al., 2017). *Tapinoma darioi* and *T. magnum* show "tramp"-species traits (Seifert et al., 2017) and have established populations outside their native range (Dekoninck et al., 2015, Seifert et al., 2017). In addition to human-assisted dispersal and having a generalist diet, tramp species exhibit polygyny (i.e., multiple reproductive queens per nest), supercoloniality (i.e., numerous interconnected nests spread over a large area), mass recruitment (e.g., the capacity to rapidly gather foragers over a resource), and ecological dominance resulting in an exclusion of other ant species (Passera, 1994, Holway et al., 2002).

While recent invasions of *Tapinoma darioi* and *Tapinoma magnum* have been documented in the Netherlands, Germany, and Belgium (Dekoninck et al., 2015, Seifert et al., 2017), these species also express invasive behaviours in Southern France (Blight et al., 2010, Berville et al., 2013). Coastal areas of Southern France have seen rapidly growing urbanization since the 1960's, and now feature contrasted land uses with juxtaposition of natural and urban areas. This is one of the few places where *Tapinoma nigerrimum*, the native species, occurs sympatrically with two invasive species of the complex, *T. darioi* and *T. magnum* (Seifert et al., 2017). The goal of our study was to study the contribution of land use to the spatial distribution of each species and interpret this contribution in light of the invasiveness-related traits known to differ between the species. To do so, we first had to develop a fast and reliable method based on microsatellite markers for the unambiguous identification of the four species within the *T. nigerrimum* species complex. These microsatellite markers also allowed the identification of other species outside this complex (e.g., *Tapinoma erraticum*, Latreille, 1798 and *Tapinoma madeirense*, Forel, 1895).

Then, we made a high-resolution mapping of the distribution of each species of the complex and linked their occurrences with urbanization levels, measured as the proportions of land-cover classes, that is, impervious, agricultural, and natural. We hypothesize a positive relationship between level of urbanization and the occurrence of *Tapinoma darioi* and *Tapinoma magnum*.

Materials and Methods

Study area

The study area is located in Southern France, along the Mediterranean coast. Sampled sites are distributed from the sea-shore to the hills in the North of Montpellier, in a broad 20 × 60 km area parallel to the coast (Fig. S1, as digital supplementary material to this article, at the journal's web pages). The climate is characterized by mild, wet winters and hot, dry summers (Leroux, 2001). From South to North, the landscapes consist of (1) alluvial coastal plains, with

sandy dunes which separate large saltwater lagoons from the Mediterranean Sea, and (2) plateaux and hills made of layers of marine sedimentary limestone that underwent folding and faulting during the Pyrenean orogeny, dominated by Mediterranean shrublands and mostly oak forests. Agricultural areas (e.g., fields, vineyards, orchards, olive groves) are present between the lagoons and the hills, wherever urbanization has not taken hold (Bornand et al., 1997, Myers et al., 2000).

The sampled areas include the urban areas of Sète (43° 24' N, 3° 42' E; 90,720 inhabitants), Montpellier (43° 36' N, 3° 52' E; 457,839 inhabitants), Lunel (43° 40' N, 4° 08' E; 48,672 inhabitants), and Nîmes (43° 50'N, 4° 21' E; 268,785 inhabitants) (Fig. 1; INSEE, 2017, 2018). Since 1968, the population of all the urban areas combined has doubled (INSEE, 2020) due to the simultaneous urbanization of the shoreline for mass tourism and the uncontrolled urban spread as a result of new inhabitants (Direction Départementale Des Territoires et de la Mer de l'Hérault, 2016). There are, however, strong heterogeneities in population dynamics among the four urban areas, with Montpellier and Lunel showing the strongest population growth (2.5 and 2.4-fold growth, respectively) and Sète and Nîmes well below (1.5 and 1.7-fold, respectively).

Biological model

Species identification in the field is impossible within the *Tapinoma nigerrimum* complex and is made even more difficult by the presence of other species of the genus *Tapinoma*, such as *T. erraticum* or *T. madeirense*. *Tapinoma simrothi* Krausse, 1911, which can be found in Southern Spain and Italy, belongs to another species complex but is morphologically very similar to the species of the *T. nigerrimum* complex. Although these other species have never been recorded in our study area, all *Tapinoma* colonies, regardless of species group, were sampled in the field for identification in the laboratory.

Sampling scheme

Based on a 1 km² mesh grid, 926 sampling points were semi-randomly positioned using the "random point under the influence of a layer" tool in QGIS version 3.10.6 (QGIS Development Team, 2019) (excluding aquatic surfaces) and sampled once from March to July 2019 in dry weather, between 15 °C and 30 °C. This climate corresponds to the highest activity period of most ants, and it is optimal for *Tapinoma* (Blatrix et al., 2013).

Ants were collected in nests or on dense trails with an entomological aspirator or flexible forceps within a radius of 15 m around each sampling point (following Gippet et al., 2017) and along four 50 m transects (oriented North, South, East, West), when the configuration allowed it. In sites where *Tapinoma* occurred, 30 individuals from one nest were collected and preserved in 96% ethanol.

Genetic identification by microsatellites

Seifert et al. (2017) used NUMOBAT to define species within the *Tapinoma nigerrimum* species complex and to identify individuals to the species level. They also used mtDNA

(Cytochrome Oxidase gene) sequencing, which supported the NUMOBAT taxonomy. However, a number of disagreements between NUMOBAT and mtDNA arose for *Tapinoma magnum* and *Tapinoma darioi* from Italy and from France.

NUMOBAT is time consuming (Klarica et al., 2011), and mtDNA markers do not give exact identifications in species complexes where hybridization or incomplete lineage sorting occur (as is the case in *Tapinoma nigerrimum* complex, Seifert et al., 2017). Following the methods developed in Cordonnier et al., (2019), 15 microsatellite markers designed for *Tapinoma magnum* to genotype one individual per colony collected were used. The details for microsatellite development, sequences, and primers can be found in Appendix S1, as digital supplementary material to this article, at the journal's web pages. The rationale behind identification by genotyping is that mutations that accumulate in microsatellite sequences should result in strong differentiation over time, especially in species which are reproductively isolated. Microsatellites are, however, known to converge by homoplasy. To overcome this obstacle, several markers have to be analyzed together. In Cordonnier et al. (2019), five species of the ant genus *Tetramorium* Mayr, 1855 were identified with 17 highly polymorphic microsatellite markers, which also revealed numerous interspecific hybrids between two species (Cordonnier et al., 2018). In the present paper, the same approach was used, with one major difference: DNA of individuals that had been subjected to both NUMOBAT and mtDNA identification in Seifert et al. (2017) was used to assign species names to genotype groups defined by microsatellite analysis.

Microsatellite development

Fifteen markers were developed from *Tapinoma magnum* individuals: The total genomic DNA was isolated from the ants collected in Lyon in 2014. The DNA was extracted following crushing (3 min at 30 Hz in a Retsch MM200 ball mill, Haan, Germany), standard digestion (proteinase K (75 µg) + 200 µl of TNES buffer (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.5% SDS)), and salt-chloroform purification. The total genomic DNA was sent to GenoScreen, Lille, France, where 1 µg was used for the development of microsatellite libraries through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries as described in Malausa et al., (2011). The total DNA was mechanically fragmented and enriched for AG, AC, AAC, AAG, AGG, ACG, ACAT, and ATCT repeated patterns. The enriched fragments were subsequently amplified. The PCR products were purified, quantified, and the GS-FLX libraries were then carried out following the manufacturer's protocols and sequenced on a GS-FLX PTP. Details for microsatellite development, sequences, and primers can be found in Appendix S1. Primer characteristics and marker accession numbers can be found in Appendix S2, Table 1.

DNA extraction

The DNA from one individual per colony collected in the field was extracted by grinding each ant in proteinase K (10 µL at 15 mg / ml) and adding Chelex 7% (150 µL), followed by a 2-hour incubation at 55 °C and an additional 15 min at 90 °C to inactivate the proteinase K.

Genotyping

Fifteen microsatellite markers were organized into three genotyping mixes (Appendix S2, Tab. 1) and run through a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) by a service provider (GENTYANE, Clermont-Ferrand, France). Forward primers were end-labelled with universal tails following Blacket et al. (2012); four different tails were used with the following fluorescent dyes – Tail_A_6FAM [6FAM]GCCTCCCTCGCGCCA, Tail_B_HEX [HEX]GCCTTGCCAGCCCGC, Tail_C_ATTO550 [ATTO550]CAGGACCAGGCTACCGTG, Tail_D_ATTO565 [ATTO565]CGGAGAGCCGAGAGGTG. The primer and tail correspondence are indicated in Appendix S2, Table 1. All three PCR mixes had a total volume of 12 µl with 1 × Master Mix Type-it microsatellite PCR kit (QIAGEN, 206246, Hilden, Germany) and 2 µl extracted DNA with 0.02 - 0.1 µM of primer forward, 0.04 - 0.2 µM of primer reverse, and 0.1 - 0.2 µM of tail. All PCRs were run with the same cycling program: 5 min, annealing at 95 °C, 36 cycles with denaturation (30 s) at 95 °C, annealing (3 min) at 60 °C, extension (30 s) at 72 °C, and a final 30 min extension at 60 °C. Electropherograms were read and interpreted with Genemarker 1.95 (Softgenetics, State College, PA, USA).

Genetic analyzes

Bayesian methods such as STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) require data that conform to several conditions, in particular the Hardy-Weinberg equilibrium within a cluster, the sample-size equilibrium of clusters, and the allelic-diversity equilibrium between clusters (Puechmaille, 2016). As basic population genetics (i.e., allelic richness, heterozygosities, F indices, null allele frequency) could not be computed before identification of species, none of these three conditions could be verified before clustering. Species identification was therefore made by using three methods concurrently: simple PCA, discriminant PCA (dACP, Jombart, 2008, Jombart et al., 2010), and GENECLASS 2 (Piry et al., 2004). To assign species names to genotypic groups defined by microsatellite analysis, the original DNA of individuals ("reference individuals") that were subjected to both NUMOBAT and mtDNA identification in Seifert et al. (2017) was used. As our samples might have included individuals from distant clades such as *Tapinoma erraticum* and *Tapinoma simrothi* species groups, a two-step approach was used. All three methods were applied on all the individuals sampled, with an addition of 15 reference individuals per described species. Each detected species group separately was then reanalyzed, again with 15 reference individuals per described species. Identification results were subsequently used as priors in Bayesian analysis (STRUCTURE, Pritchard et al., 2000) for confirmation. The detailed identification methods and results can be found in Appendix S1 to 4, respectively.

Spatial analyses

Spatial analyses were based on 2015 landscape data from the OCS GE (Occupation du sol à Grande Echelle) Version 1.1 for Hérault and Gard departments from IGN (Institut National de l'Information Géographique et Forestière). The scale of use is 1:2500. OCS GE vector files have 14 land-cover classes and 17 land-use classes. Minimal polygon areas are 200 m² within built-up areas, 500 m² within urban zones, and 2500 m² outside urban zones. In a 250 m

radius buffer around each sampling site, the percentage of urbanization (% urban, comprising two land-cover classes: impervious built-up CS (“Couverture du sol” in French or land cover) 1.1.1.1 and impervious none built-up CS 1.1.1.2), the percentage of agricultural land-use (% agri, land-use class Agriculture US (“usage du sol” in french or land use) 1.1), and the percentage of natural areas (% natural, land-cover classes Forests CS 2.1.1 and Scrublands CS 2.1.2 were calculated; other classes in this category were not taken into account as they include anthropic land uses such as gardens, lawns, or crops). Water surfaces (CS 1.2.2) were subtracted from the analyses.

The distance to the coast (in meters) was also measured using the coastline and the "Join attributes by nearest" tool (QGIS Development Team, 2019). The distance to the coast was used to represent a habitat and niche gradient, from sand-dunes to sedimentary agricultural plain to dry, forested hillsides. All analyses were performed using QGIS 3.10.6 (QGIS development Team, 2019).

Statistical analyses

Normality distributions of the four landscape variables were tested using a Shapiro-Wilk-Test. As the data were non-normal, we measured the correlations between the four variables using a Spearman rank correlation test (Borcard et al., 2018). To study the probability of occurrence of the detected species as a function of explanatory variables, generalized linear models (GLMs) with binomial logistic error (also called logistic models) were used. These models are suitable for presence / absence data (Crawley, 2009). The effect and shape of effects were tested for all three land-cover variables, for the distance to the coast, and for the interaction between % urban and distance to the coast (Tabs. 1 and 2). For land-cover variables, linear, quadratic (i.e., by combining parameter + parameter^2), and cubic models (parameter + parameter^2 + parameter^3) were tested. For all models, except for the distance to the coast one, a model selection protocol was followed using the Akaike Information Criteria (AIC). The best model selected was the one with the lowest AIC depending on the number of parameters studied (adding one parameter must decrease the AIC by two unities to improve the model). The AIC thus achieved the best compromise between data adjustment and model parsimony (Crawley, 2009). For each model, the significance of the parameters was calculated using a type III Analysis of variance, adapted to logistic regressions (package “car”; Fox & Weisberg, 2019). The display of the models was produced using the “effect” package (Fox et al., 2020). Different types of models (linear, quadratic, and cubic) were tested because along this gradient environmental parameters could show linear but also more complex responses, with thresholds and hump-shaped curves (McDonnell & Hahs, 2008, Crawley, 2009).

All statistical analyses were computed using R version 3.6.2 (R Development Core Team, 2019), and RStudio (RStudio Team, 2020).

Results

Species occurrences

From the 926 sampling sites, individuals from 373 *Tapinoma* colonies were collected. DNA analyses identified 197 *Tapinoma nigerrimum* (21.27% of occurrences), 78 *Tapinoma darioi* (8.42%), 6 *Tapinoma magnum* (0.65%), 1 *Tapinoma ibericum* (0.11%) and 91 *Tapinoma madeirense* (9.83%). We did not detect any *Tapinoma* in the remaining 553 points (59.72%) (Fig. 1). As *T. magnum* and *T. ibericum* were uncommon and *T. madeirense* does not belong to the *T. nigerrimum* species group, they were not included in the statistical analyses.

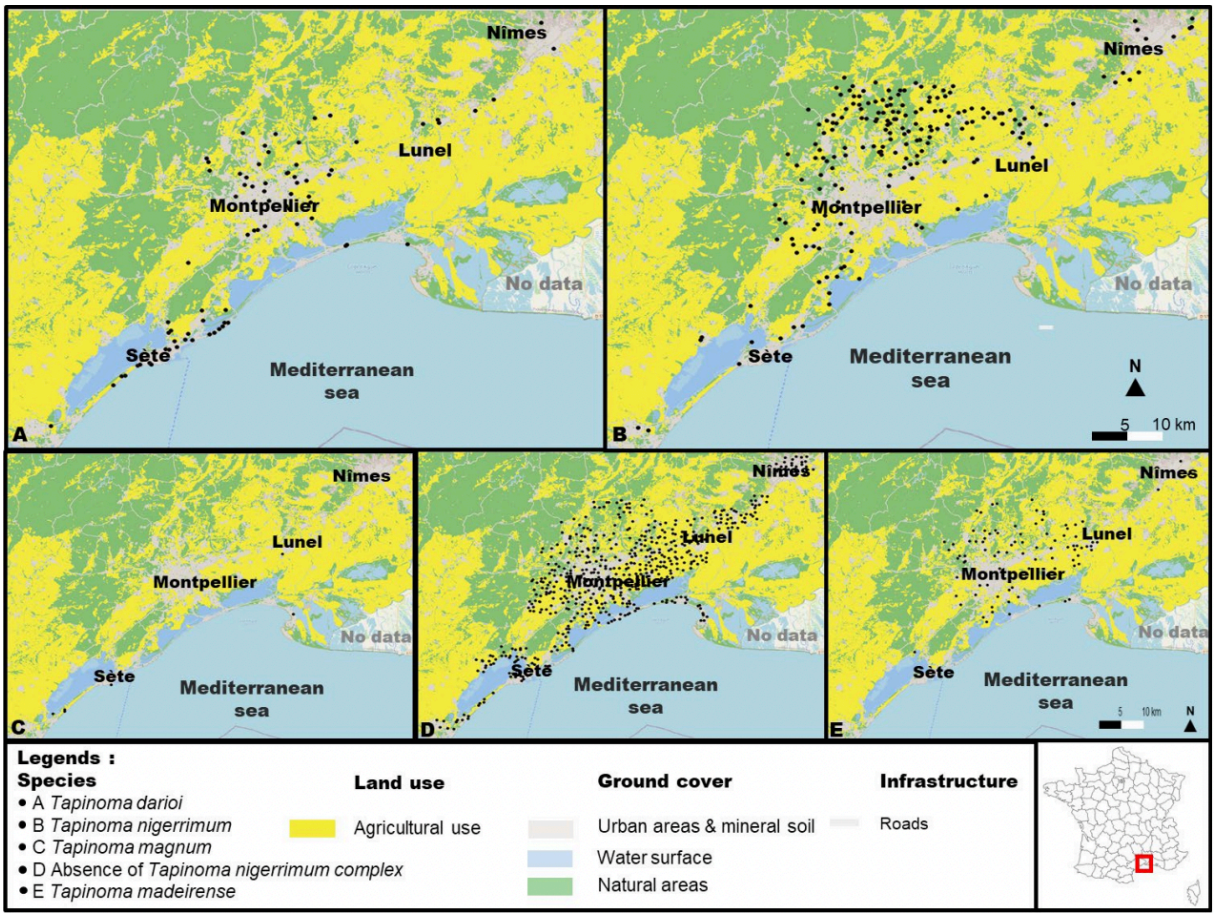


Figure 1: Distribution maps of the three species of the *Tapinoma nigerrimum* complex found in the sampling area. Map D shows all sampled sites where no species of the *T. nigerrimum* complex could be found. Map E shows the occurrence of *Tapinoma madeirense* for information, although it is not part of the *Tapinoma nigerrimum* complex. *Tapinoma ibericum* was only present in Mèze (% urban = 0.86, close to the coast) and therefore not shown.

Correlations between variables and study area description

All variables were weakly but significantly correlated (p-value < 0.001), except for the % urban versus % agri (correlation coefficient = - 0.6) and % agri versus % natural (correlation coefficient = - 0.5) which were highly correlated (Fig. S2.). The total buffers represent 29.56% natural areas, 21.73% urban areas, and 29.02% for agricultural use.

Effects of land-cover and land-use on the probability of occurrence for *Tapinoma nigerrimum* and *Tapinoma darioi*

Natural areas

Our study area comprised 35.24% natural areas that contained 9 *Tapinoma darioi*, 1 *Tapinoma magnum*, 65 *Tapinoma nigerrimum*, 21 *Tapinoma madeirense*, and 0 *Tapinoma ibericum* colonies. Natural areas had significant effects on the distribution of both species. For *T. nigerrimum*, GLMs showed a positive effect of % natural (Fig. 2A). Conversely, for *T. darioi*, GLMs showed a negative effect of % natural (Fig. 2B). The best models according to the AIC for % natural was the linear models (Tabs. 1 and 2).

Urban areas

Our study area comprised 13.30% urban areas containing 37 *Tapinoma darioi*, 1 *Tapinoma magnum*, 38 *Tapinoma nigerrimum*, 26 *Tapinoma madeirense* and 1 *Tapinoma ibericum* colonies. For *T. nigerrimum*, the best selected model (AIC = 890.79) was the cubic model (Tab. 1; Fig. 2C). The probability of occurrence of *T. nigerrimum* was very high (0.5 to 0.1) from 0 to 20% of % urban followed by a plateau (probabilities between 0.1 and 0.15) from 20 to 70% of % urban. Above 70%, the probabilities dropped to 0.

For *Tapinoma darioi*, the best model according to AIC was the quadratic effect of % urban on the probability of occurrence (Tab. 2; Fig. 2D). The probabilities of occurrences were maximized around 75% of % urban, and dropped below 0.05 below 20% and above 95% of % urban (Tab. 2; Fig. 2D).

Agricultural land-use

Our study area comprised 30.31% agricultural use areas containing 7 *Tapinoma darioi*, 0 *Tapinoma magnum*, 58 *Tapinoma nigerrimum*, 23 *Tapinoma madeirense* and 0 *Tapinoma ibericum* colonies. For *Tapinoma nigerrimum*, the best selected model was the quadratic model (Tab. 1; Fig. S3A). The probability of occurrence of *T. nigerrimum* was maximized at around 50% of % agri at 0.3 and dropped below 0.15 below 30% and above 80% of % agri (Tab. 1; Fig. S3A).

For *Tapinoma darioi*, GLMs showed a negative effect of % agri (Fig. S3B). The best model according to the AIC for % agri was the linear model (Tab. 2).

Distance to coast

The probability of occurrence of *Tapinoma nigerrimum* was positively and linearly correlated with the distance to the coast (Tab. 1; Fig. 2E). Conversely, the probability of occurrence of *Tapinoma darioi* decreased linearly as we moved away from the coast (Tab. 2; Fig. 2F).

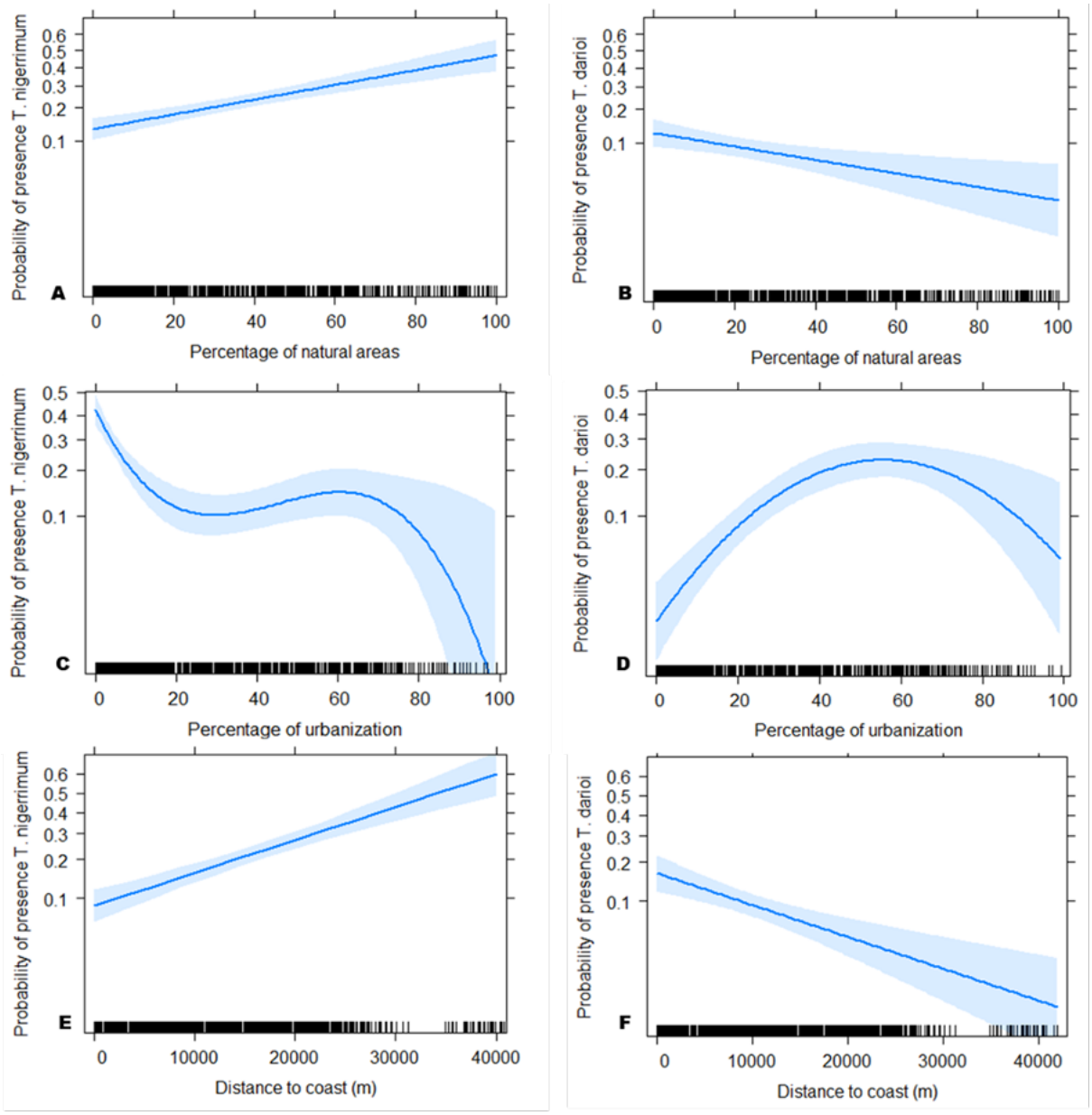


Figure 2: Probabilities of occurrence for (A) *Tapinoma nigerrimum* (linear model, p-value < 0.001) and (B) *Tapinoma darioi* (linear model, p-value < 0.001) as a function of percentage of natural landscapes in a 250 m radius circular buffer around sampling sites (% natural). Probabilities of occurrence for (C) *Tapinoma nigerrimum*, (cubic model, p-value < 0.001) and (D) *T. darioi*, (quadratic model, p-value < 0.001), as a function of percentage of urban landscapes in a 250 m radius circular buffer around sampling sites (% urban). Probabilities of occurrence for (E) *T. nigerrimum* and (F) *T. darioi* as a function of the distance to the coast in meters with a p-value < 0.001. The light blue area represents the standard error. The rug plot at the bottom of the graph shows the number of sampling points corresponding to % urban values.

Interactions between distance to the coast and portion of urban land use:

For *Tapinoma nigerrimum*, the best model was the interaction (Tab. 1; Fig. S4A), with the probability of occurrence higher in urbanized areas close to the coast, decreasing as we moved away from the coast. The best model was the interaction model also for *Tapinoma darioi* (Tab. 2). However, the interaction was not significant (Tab. 2). As shown in Figure S4B, the same response to % urban was observed independently of the distance to the coast: The probability of occurrence of *T. darioi* peaks at 60% of % urban whatever the distance to the coast. However, far from the coast, the probabilities for *T. darioi* decreased to < 0.05 at low values of % urban, while near the coast, this decrease was less pronounced at 0.12 but the standard error was larger (Fig. S4B).

Table 1: Results of Generalized Linear Models showing the effects of the variables on the occurrence of *Tapinoma nigerrimum*. % nat: percentage of natural areas, % urban: percentage of urbanization, % agri: percentage of area for agricultural use, distance: distance to the coast, interaction % urban distance: interaction between % urban and distance to the coast. Bold lines correspond to the best models by variable according to the Akaike Information Criteria (AIC).

Models	Formula	AIC	Estimate	Standard error	P-Value	Figures
% nat linear	**% natural**	**922.45**	**0.017987**	**0.002833**	**<0.001**	**Fig. 2. A**
% nat quadratic	% natural %natural²	924.44	1.710e-02 9.588e-06	1.011e-02 1.052e-04	0.08933 0.92741	Not shown
% nat cubic	% natural % natural² % natural^3	925.68	-1.435e-03 5.212e-04 -3.567e-06	2.346e-02 5.958e-04 4.092e-06	0.9512 0.3825 0.3838	Not shown
% urban linear	% urban	911.69	-0.025989	0.004051	<0.001	Not shown
% urban quadratic	% urban % urban²	902.94	-0.0613954 0.0005376	0.0115195 0.0001566	<0.001 <0.01	Not shown
% urban cubic	**% urban** **% urban²** **% urban^3**	**890.79**	**-1.513e-01** **3.807e-03** **-2.820e-05**	**2.811e-02** **9.598e-04** **8.513e-06**	**<0.001** **<0.001** **<0.001**	**Fig. 2. C**
% agri linear	% agri	957.67	0.005635	0.002534	<0.05	Not shown
% agri quadratic	**% agri** **% agri²**	**937.64**	**0.0462602** **-0.0004993**	**0.0091596** **0.0001095**	**<0.001** **<0.001**	**Fig. S3. A**
% agri cubic	% agri % agri² % agri^3	935.64	8.226e-02 -1.650e-03 8.780e-06	2.019e-02 5.822e-04 4.340e-06	<0.001 <0.01 <0.05	Not shown
distance linear	**distance**	**901.67**	**6.884e-05**	**9.134e-06**	**<0.001**	**Fig. 2. E**
Interaction % urban distance	**distance** **% urban^3** **% urban** **% urban^3:distance**	**853.49**	**8.375e-05** **5.278e-06** **-3.589e-02** **-1.683e-10**	**1.147e-05** **1.367e-06** **7.698e-03** **6.293e-11**	**<0.001** **<0.001** **<0.001** **<0.01**	**Fig. S4. A**

Table 2: Results of Generalized Linear Models with binomial logistic "error", showing the effects of the variables on the occurrence of *Tapinoma darioi*. % nat: percentage of natural areas, % urban: percentage of urbanization, % agri: percentage of area for agricultural use, distance: distance to the coast, interaction % urban distance: interaction between the % urban and distance to the coast. Bold lines correspond to the best models by variable according to the Akaike Information Criteria (AIC).

Models	Formula	AIC	Estimate	Standard error	P-Value	Figures
% natural linear	**% natural**	**528.94**	**-0.016144**	**0.005462**	**<0.01**	**Fig. 2. B**
% natural quadratic	% natural %natural²	528.81	0.0068496 -0.0003186	0.0170569 0.0002321	0.6861 0.1438	Not shown
% natural cubic	% natural % natural² % natural^3	530.38	-1.357e-02 3.847e-04 -5.905e-06	3.573e-02 1.117e-03 9.336e-06	0.7039 0.7286 0.5137	Not shown
% urban linear	% urban	504.39	0.025342	0.004307	<0.001	Not shown
% urban quadratic	**% urban** **% urban²**	**487.71**	**0.0941229** **-0.0008457**	**0.0180119** **0.0002137**	**<0.001** **<0.001**	**Fig. 2. D**
% urban cubic	% urban % urban² % urban^3	485.42	1.694e-01 -3.016e-03 1.651e-05	4.173e-02 1.065e-03 7.740e-06	<0.001 <0.01 <0.05	Not shown
% agri linear	**% agri**	**509.48**	**-0.026834**	**0.005841**	**<0.001**	**Fig. S3. B**
% agri quadratic	% agri % agri²	511.31	-0.0204340 -0.0000992	0.0163521 0.0002400	0.2129 0.6750	Not shown
% agri cubic	% agri % agri² % agri^3	511.57	-6.089e-02 1.523e-03 -1.453e-05	3.586e-02 1.307e-03 1.184e-05	0.07868 0.22644 0.18748	Not shown
distance linear	**distance**	**518.93**	**-0.0000662**	**0.0000157**	**<0.001**	**Fig. 2. F**
Interaction % urban distance	**distance** **% urban²** **% urban** **% urban²:distance**	**483.12**	**-3.876e-05** **-8.232e-04** **9.036e-02** **-1.327e-09**	**2.346e-05** **2.168e-04** **1.872e-02** **7.982e-09**	**0.09478** **<0.001** **<0.001** **0.86660**	**Fig. S4. B**

Discussion

Species occurrence in the *Tapinoma nigerrimum* complex

Tapinoma nigerrimum was found in 21% of the sampled points, making it the most frequently observed species of the complex, far beyond *Tapinoma darioi* (8%), *Tapinoma magnum* (1%), and *Tapinoma ibericum* (1 site). Indeed, it is considered a fairly common species in Southern France (Blatrix et al., 2013), described in 1856 on the basis of specimens from the surroundings of Montpellier, although it may have been confused with other species of the complex (Seifert et al., 2017). It can also be noted that *Tapinoma* supercolonies (*magnum* or *darioi*) were observed in Valras-Plage (15 km South-East of sampling zone) and Port-Leucate (120 km South-East) in 1991 (B. Kaufmann, unpubl.).

Our results are comparable with those obtained by Gippet et al. (2017) in the urban area of Lyon for the genus *Lasius* Fabricius, 1804, where native species are much more common than the invasive *Lasius neglectus*. Interestingly, the relative rarity of *Tapinoma magnum* in the urban area of Montpellier was not expected because Seifert et al. (2017) had observed this species along the coast nearly as often as *Tapinoma darioi*. Further studies would allow us to understand the causes of this difference, such as inspecting museum collections to determine the date of introduction, studying how the two species are introduced and dispersed in the region to determine the routes of invasion and vectors, and conducting competition experiments in the field or in the laboratory. *Tapinoma ibericum* was only observed once, which is consistent with the observations of Seifert et al., (2017), who only reported one single invaded site outside the Iberian Peninsula, on the Isle of Wight.

Distinct spatial patterns between non-invasive and invasive species

Neither *Tapinoma nigerrimum* nor *Tapinoma darioi* showed a linear response to urbanization. While *T. nigerrimum* was mainly observed in natural areas on limestone plateaus and hills mostly covered with Mediterranean forests, the tramp species *T. darioi* peaked at intermediate levels of urbanization. These results support our hypothesis of a positive relation between urbanization and the occurrence of species that exhibit traits common in invasive ants. These results are also consistent with Seifert et al. (2017), who suggested that *T. darioi* is more abundant in sites impacted by human activities, whereas *T. nigerrimum* prefers natural and semi-natural habitats.

Three non-exclusive hypotheses can be proposed to explain these distinct distributions. First, the observed distribution may result from the historical presence of both species in the area before the expansion of the city of Montpellier. *Tapinoma darioi* is commonly found in open sandy habitats along the coast and might have persisted despite urbanization. Second, like most invasive species, *T. darioi* could have been introduced and spread in urban areas where most native species usually disappear (Cadotte et al., 2017). While for *Tapinoma nigerrimum* most new founding queens probably disperse on the wing, in *T. darioi*, it is more likely that passive human-mediated dispersal occurs (Seifert et al., 2017). As has been shown in fire ants (King et al., 2009) or in Argentine ants (Suarez et al., 2001), dispersal of ants occurs at medium and long distances through the transport of soil containing colony fragments with adult or larval queens (e.g., Suhr et al., 2019). Gippet et al., (2017) found that *Lasius neglectus* was detected at significantly higher probabilities in major road embankments, which was interpreted as the impact of landscaping generating important transportation of soil.

Moreover, intermediate levels of urbanization corresponding to the green suburbs of the largest cities, as well as in urban parks and tourist towns close to the coast, offer a heterogeneous environment (McKinney, 2006, Cadenasso et al., 2007, Clergeau, 2007). This environment could provide habitat patches for invasive species such as *Tapinoma darioi*, while filtering against ecological traits exhibited by *Tapinoma nigerrimum*. *Tapinoma*

nigerrimum does not have the characteristics of a tramp species (Passera, 1994): monodomous (only one nest per colony, and colonies behave aggressively to one another; Seifert et al., 2017). Its social system is therefore similar to *Lasius niger* and *Tetramorium immigrans*, which are the most urban tolerant species in most of Europe. As it builds 20 - 40 cm high large dome-shaped nests in open areas, it might be negatively affected by constant mowing and soil compaction found in urban greenspaces, which may explain this absence. Conversely, *T. darioi*'s supercolonial organization, where many interconnected nests make up the whole of the colony, can facilitate the access to numerous nesting sites in the heterogeneous suburban landscape, where parts of the colony can concentrate depending on the season and available resources, as has been observed in the Argentine ant as well as in *Tapinoma sessile* (Heller & Gordon, 2006, Menke et al., 2010).

The rarity of *Tapinoma darioi* in dense city centers might be explained by the absence of both suitable nesting sites and food resources. It is also possible that *T. darioi* has established itself in disturbed habitats with less interspecific competition (Cadotte et al., 2017). Indeed, potential competitors such as *Tetramorium immigrans* Santschi, 1927, *Lasius niger* (Linnaeus, 1758), or *Pheidole pallidula* (Nylander, 1849) are present in denser parts of the urban gradient (Madre et al., 2013). Unfortunately, as stated above, it is impossible to know whether *T. darioi* was already present before the expansion of the city, making the current distribution of the *Tapinoma nigerrimum* species complex difficult to explain.

Third, dense urban areas are characterized by urban heat islands, where heat-radiating buildings and canyon effects impose a steep, rising temperature gradient from rural areas to city centers, with the effect being stronger in larger cities. *Tapinoma darioi* could be better adapted to the higher temperatures of urban areas or in the middle of dunes close to the coast compared with *Tapinoma nigerrimum.* Indeed, even closely related ant species may differ in their thermal tolerance (e.g., Cerdá et al., 1998). Moreover, Angilletta et al., (2007) showed that ectotherms such as ants in urban areas are more heat tolerant than those in rural areas. Bujan et al., (2021) have recently shown that *Tapinoma magnum* can shift its thermal niche, a capacity for thermal plasticity that *T. darioi* might also possess.

Conclusion

We used microsatellites to confirm species identities in the *Tapinoma nigerrimum* species complex to improve our knowledge of the occurrence and distribution of species in this complex in Southern France. Biodiversity does not only provide services, and this must be taken into account in the management of cities. As other invasive ants have been shown to decrease local ant and soil arthropod diversity (e.g., *Lasius neglectus*; see Nagy et al., 2009), further research should examine the ecological consequences of *Tapinoma darioi* and *T. nigerrimum* on the richness and abundance of the local arthropod and plant communities.

Acknowledgements

We thank Bernhard Seifert and Massimiliano Centorame for providing part of the reference individuals from Seifert et al., (2017) which were used in this study. We thank Annick Lucas for her collaboration and her availability. We also thank all collaborators who actively participated in the collecting of *Tapinoma* ants and more specifically Yannick Juvé, Célian Diblasi, Pierre-Louis Duarte, Célia Lecomte, Ambre Mautuit, Corentin Sagnet, and Julien Tchilingrian. We also thank Cyril Bernard, assistant engineer at the CNRS, for his advice given on QGIS. We are grateful for the funding provided by Doctoral School 60, CNRS-PEPS, as well as the LABEX IMU (ANR-10-LABX-0088) of Université de Lyon.

References

Angilletta MJ, Wilson RS, Niehaus AC, et al (2007) Urban Physiology: City Ants Possess High Heat Tolerance. PLoS One 2:e258. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000258

Berville L, Hefetz A, Espadaler X, et al (2013) Differentiation of the ant genus Tapinoma (Hymenoptera: Formicidae) from the Mediterranean Basin by species-specific cuticular hydrocarbon profiles. Myrmecological News 18:77–92

Blacket MJ, Robin C, Good RT, et al (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. Molecular Ecology Resources 12:456–463. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x

Blatrix R, Galkowski C, Lebas C, Wegnez P (2013) Fourmis de France, de Belgique et du Luxembourg. Luçon, Delachaux et Niestlé, 288 pp.

Blight O, Provost E, Renucci M, et al (2010) A native ant armed to limit the spread of the Argentine ant. Biological Invasions 12:3785–3793. https://doi.org/10.1007/s10530-010-9770-3

Borcard D, Gillet F, Legendre P (2018) Numerical Ecology with R. Springer, Cham, pp. 299-367.

Bornand M, Robbez-masson J-M, Donnet A, Lacaze B (1997) Caractérisation des sols et paysages des garrigues méditerranéennes. Typologie et extrapolation spatiales par traitement d'images satellitaires. Étude et Gestion des Sols 4: 27-42.

Bujan J, Charavel E, Bates OK, Gippet JMW, Darras H, Lebas C, Bertelsmeier C (2021) Increased acclimation ability accompanies a thermal niche shift of a recent invasion. Journal of Animal Ecology 90:483–491. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13381

Cadenasso ML, Pickett STA, Schwarz K (2007) Spatial heterogeneity in urban ecosystems: Reconceptualizing land cover and a framework for classification. Frontiers in Ecology and the Environment 5:80–88

Cadotte MW, Yasui SLE, Livingstone S, MacIvor JS (2017) Are urban systems beneficial, detrimental, or indifferent for biological invasion? Bioogical Invasions 19:3489–3503. https://doi.org/10.1007/s10530-017-1586-y

Cerdà X, Retana J, Manzaneda A (1998) The role of competition by dominants and temperature in the foraging of subordinate species in Mediterranean ant communities. Oecologia 117: 404-412.

Clergeau P (2007) Une écologie du paysage urbain. Edition Apogée, Rennes, 144 pp.

Cordonnier M, Bellec A, Dumet A, et al (2018) Range limits in sympatric cryptic species: a case study in *Tetramorium* pavement ants (Hymenoptera: Formicidae) across a biogeographical boundary. Insect Conservation and Diversity 12:109–120. https://doi.org/10.1111/icad.12316

Cordonnier M, Gibert C, Bellec A, Kaufmann B, Escarguel G (2019) Multi-scale impacts of urbanization on species distribution within the genus *Tetramorium*. Landscape Ecology 34:1937–1948. https://doi.org/10.1007/s10980-019-00842-7

Crawley MJ (2009) The R Book. Wiley-Blackwell, Chicago, IL, 942 pp.

Dekoninck W, Parmentier T, Seifert B (2015) First records of a supercolonial species of the *Tapinoma nigerrimum* complex in Belgium (Hymenoptera: Formicidae) (Hymenoptera: Formicidae). Bulletin de la Société royale belge d'Entomologie 151: 206-209.

Direction Départementale des Territoires et de la Mer de l'Hérault (2016) https://www.herault.gouv.fr/Services-de-l-Etat/Agriculture-environnement-amenagement-et-logement/Direction-Departementale-des-Territoires-et-de-la-Mer-de-l-Herault- DDTM-34

Fox J & Weisberg S (2019) An R companion to applied regression, 3rd edn. Sage, Thousand Oaks, CA, 607 pp.

Fox J, Weisberg S, Friendly M, Hong J, Anderson T, Firth D, Taylor S, the R Core Team 2020: Package "effects" Effect Displays for Linear, Generalized Linear, and Other Models.

Gippet JMW, Mondy N, Diallo-Dudek J, Bellec A, Dumet A, Mistler L, Kaufmann B (2017) I'm not like everybody else: urbanization factors shaping spatial distribution of native and invasive ants are species-specific. Urban Ecosystems 20:157–169. https://doi.org/10.1007/s11252-016-0576-7

Hale JD, Fairbrass AJ, Matthews TJ, Sadler JP (2012) Habitat Composition and Connectivity Predicts Bat Presence and Activity at Foraging Sites in a Large UK Conurbation. PLoS One 7:e33300. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033300

Heller NE, Gordon DM (2006) Seasonal spatial dynamics and causes of nest movement in colonies of the invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). Ecological Entomology 31:499–510. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2006.00806.x

Heterick BE, Lythe M, Smithyman C (2013) Urbanisation factors impacting on ant (Hymenoptera: Formicidae) biodiversity in the Perth metropolitan area, Western Australia: Two case studies. Urban Ecosystems 16:145–173. https://doi.org/10.1007/s11252-012-0257-0

Holway DA, Lach L, Suarez AV, Tsutsui ND, Case TJ (2002) The Causes and Consequences of Ant Invasions. Annual Review of Ecology and Systematics 33:181–233. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150444

INSEE (2017) https://www. insee.fr/fr/information/2016807.

INSEE (2018) https://www. insee.fr/fr/information/2016807

INSEE (2020) www.insee.fr/fr/ statistiques/2011101?geo=AU2010-015.

Jombart T (2008) Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24:1403–1405. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129

Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genet 11:94. https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94

King JR, Tschinkel WR, Ross KG (2009) A case study of human exacerbation of the invasive species problem: Transport and establishment of polygyne fire ants in Tallahassee, Florida, USA. Biological Invasions 11:373–377. https://doi.org/10.1007/S10530-008-9254-X/FIGURES/1

Klarica J, Bittner L, Pallua J, et al (2011) Near-Infrared Imaging Spectroscopy as a Tool to Discriminate Two Cryptic *Tetramorium* Ant Species. Journal of Chemical Ecology 37:549–552. https://doi.org/10.1007/S10886-011-9956-X

Leroux M (2001) Les climats subtropicaux dits «méditerranéens» et les climats de la Méditerranée (1re partie). L'information géographique 65:304–320. https://doi.org/10.3406/ingeo.2001.2773

Lintott PR, Barlow K, Bunnefeld N, et al (2016) Differential responses of cryptic bat species to the urban landscape. Ecology and Evolution 6:2044–2052. https://doi.org/10.1002/ECE3.1996

Madre F, Vergnes A, Machon N, Clergeau P (2013) A comparison of 3 types of green roof as habitats for arthropods. Ecological Engineering 57:109–117. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.029

Malausa T, Gilles A, Meglécz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Délye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre V, Lung-Escarmant B, Malé PJG, Ferreira S, Martin JF (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. Molecular Ecology Resources 11:638–644. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02992.x

McDonnell MJ & Hahs AK (2008) The use of gradient analysis studies in advancing our understanding of the ecology of urbanizing landscapes: Current status and future directions. Landscape Ecology 23:1143–1155

McKinney ML (2002) Urbanization, Biodiversity, and Conservation. The impacts of urbanization on native species are poorly studied, but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. Bioscience 52:883–890. https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0883:ubac]2.0.co;2

McKinney ML (2006) Urbanization as a major cause of biotic homogenization. Biological Conservation, 127:247-260.

Menke SB, Booth W, Dunn RR, et al (2010) Is It Easy to Be Urban? Convergent Success in Urban Habitats among Lineages of a Widespread Native Ant. PLoS One 5:e9194. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009194

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403:853–858

Nagy C, Tartally A, Vilisics F, Merkl O, Szita E, Szél G, Podlussány A, Rédei D, Csősz S, Pozsgai G, Orosz A, Szövényi G, Markó V (2009) Effects of the invasive garden ant, *Lasius neglectus* Van Loon, Boomsma & Andrásfalvy, 1990 (Hymenoptera: Formicidae), on arthropod assemblages: pattern analyses in the type supercolony. Myrmecological News 12: 171-181.

Padayachee AL, Irlich UM, Faulkner KT, et al (2017) How do invasive species travel to and through urban environments? Biological Invasions 19:3557–3570. https://doi.org/10.1007/S10530-017-1596-9

Passera L (1994) Characteristics of tramp species. In: Williams D.F. (Ed.): Exotic Ants: Biology, impact, and control of introduced species. Westview Press, Boulder, CO, USA, pp. 23-43.

Pickett STA, Cadenasso ML (2007) Linking ecological and built components of urban mosaics: an open cycle of ecological design. Journal of Ecology 0:071029080921001-??? https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01310.x

Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, et al (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. Journal of Heredity 95:536–539. https://doi.org/10.1093/jhered/esh074

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959

Puechmaille SJ (2016) The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. Molecular Ecology Resources 16:608–627. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512

QGIS Development Team (2019) QGIS, a free and open source geographic information system. Version 3.10.6.

R Development Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.r-project.org/ index.html.

RStudio Team (2020) RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. –<http://www.rstudio.com/>, retrieved on 22 November 2020.

Seifert B, D'Eustacchio D, Kaufmann B, et al (2017) Four species within the supercolonial ants of the *Tapinoma nigerrimum* complex revealed by integrative taxonomy (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News 24:123–144

Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2001) Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: Insights from argentine ants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:1095–1100. https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1095

Suhr EL, O'Dowd DJ, Suarez AV, et al (2019) Ant interceptions reveal roles of transport and commodity in identifying biosecurity risk pathways into Australia. NeoBiota 53:1. https://doi.org/10.3897/NEOBIOTA.53.39463

Valéry L, Fritz H, Lefeuvre JC, Simberloff D (2008) In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. Biological Invasions 10:1345–1351

Valéry L, Fritz H, Lefeuvre JC, Simberloff D (2009) Invasive species can also be native... Trends in Ecology & Evolution 24:585

Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human Domination of Earth's Ecosystems. Science 277: 494-499.

Annexes

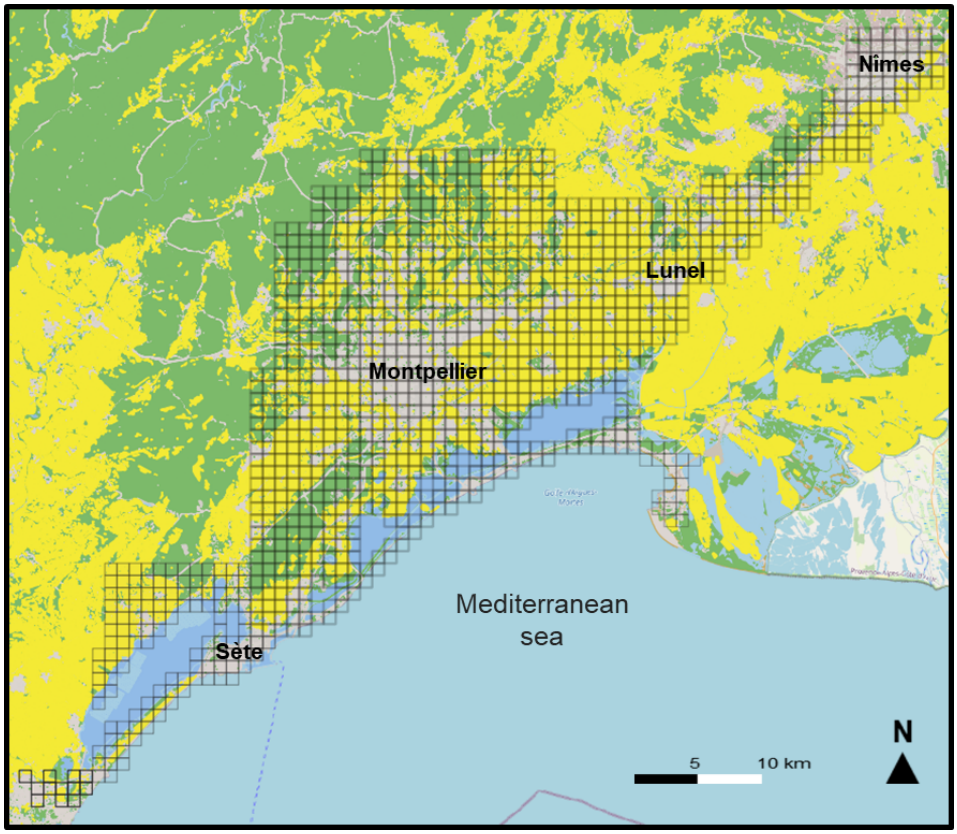


Figure S1: Square grid mesh of 1km² on the study area.

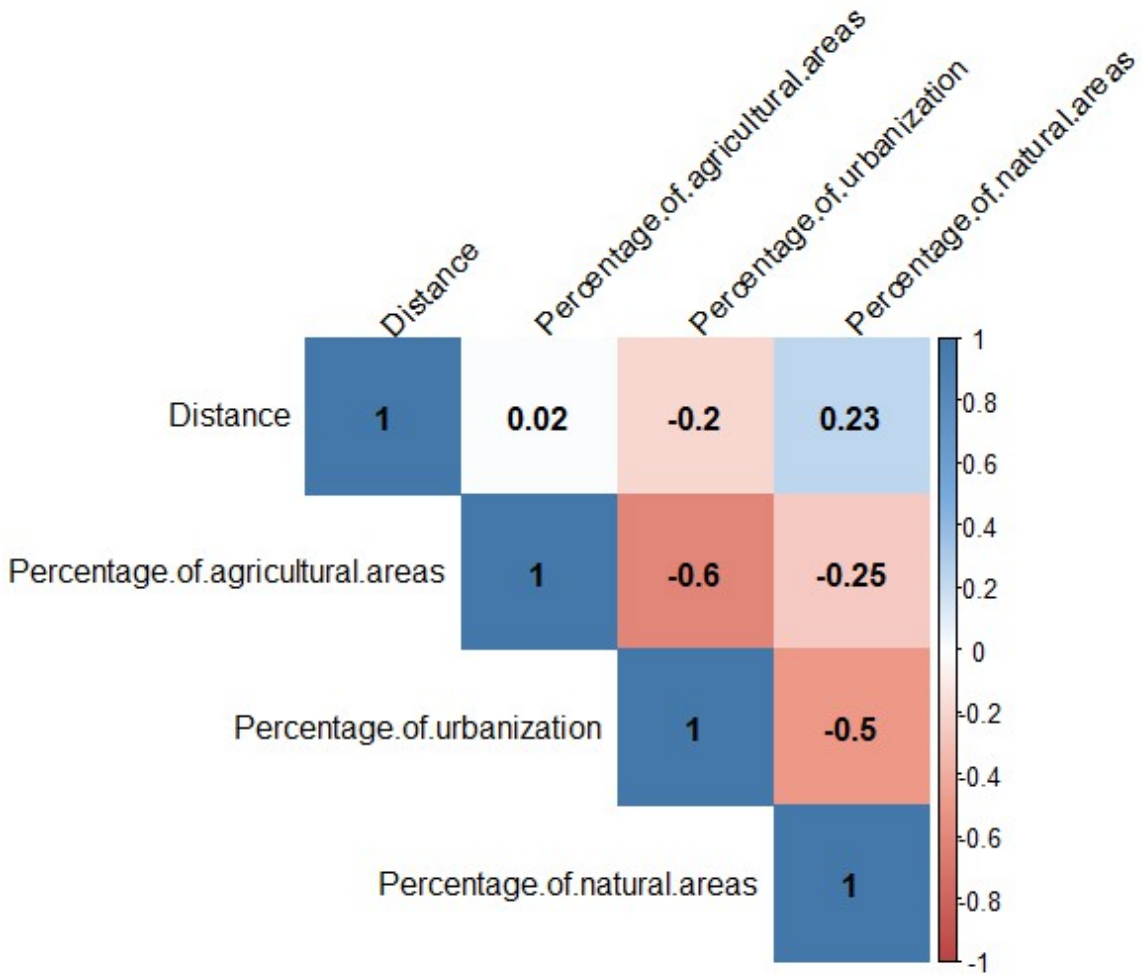


Figure S2: Correlogram between the variables studied: “percentage of agricultural areas”, “percentage of urbanization”, “percentage of natural areas”, and the variable distance to the coast. The key in red corresponds to a negative correlation and the key in blue corresponds to a positive correlation according to the Spearman correlation test.

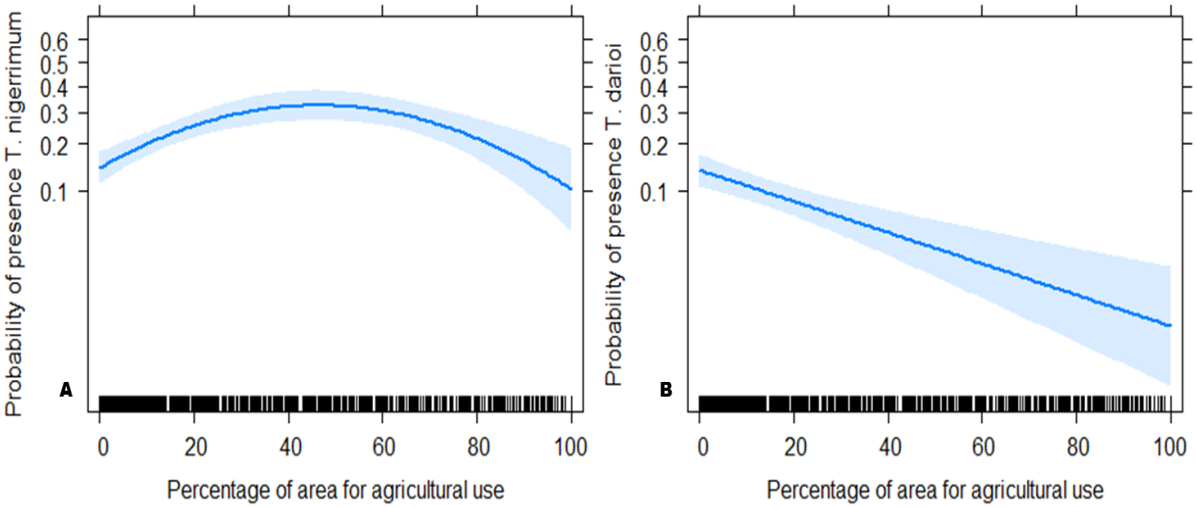


Figure S3: Probabilities of occurrence for (A) *T. nigerrimum* (quadratic model, pvalue <0.001) and (B) *T. darioi* (linear model, pvalue <0.001), as a function of percentage of area for agricultural use in a 250m radius circular buffer around sampling sites (% agri). The light blue area represents the standard error. The rug plot at the bottom of the graph shows the number of sampling points corresponding to % agri values.

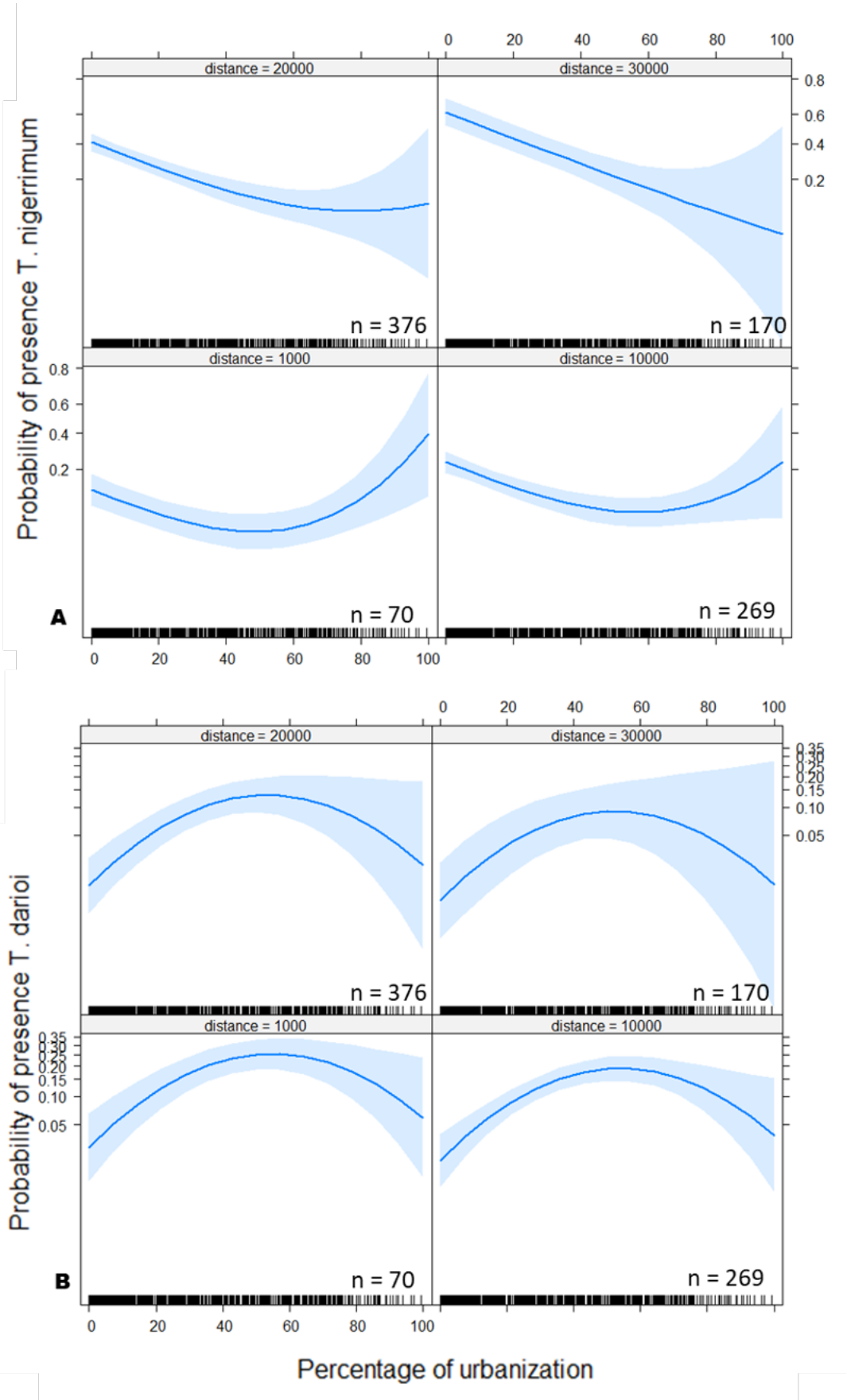

distance = 20000
distance = 30000
distance = 1000
distance = 10000
n = 376
n = 170
n = 70
n = 269
Probability of presence T. nigerrimum
A
Probability of presence T. darioi
B
Percentage of urbanization

Figure S4: Probabilities of occurrence for (A) *T. nigerrimum* (pvalue <0.01) and (B) *T. darioi*, (pvalue = 0.87) according to the interaction of urbanization and distance to the coast. The light blue area represents the standard error. n: number of points per class. The rug plot at the bottom of the graph shows the number of sampling points corresponding to % urban values. The direction in which the graphics are read begins at the bottom, from left to right and then at the top from left to right.

CHAPITRE 2

Étude comparative de la structuration génétique de trois espèces de fourmis du genre *Tapinoma*

1. RÉSUMÉ

• Introduction

L'urbanisation est un phénomène mondial et une des principales causes de l'appauvrissement de la biodiversité, avec une diminution des espèces intolérantes aux villes et une augmentation de la fréquence des espèces exotiques ou indigènes tolérantes aux villes (Grimm et al., 2008 ; Heterick et al., 2013 ; Jokimäki et al., 2016 ; McKinney & Lockwood, 1999 ; McKinney, 2006 ; McKinney, 2008). Une autre conséquence, en plus du changement d'usage des sols, est la fragmentation du paysage, due aux infrastructures urbaines, qui pourrait entraîner une moindre connectivité pour la plupart des espèces (Colyn et al., 2015 ; Davis et al., 2010 ; Frantz et al., 2009 ; Jha & Kremen, 2013 ; Munshi-South et al., 2013). Du point de vue de la génétique des populations, la réduction et la fragmentation de l'habitat équivalent à une diminution simultanée de la taille effective de la population, de la diversité et du flux génétique (exemple Figure 28), avec des conséquences sur la survie des populations (Colyn et al., 2015 ; Frantz et al., 2009).

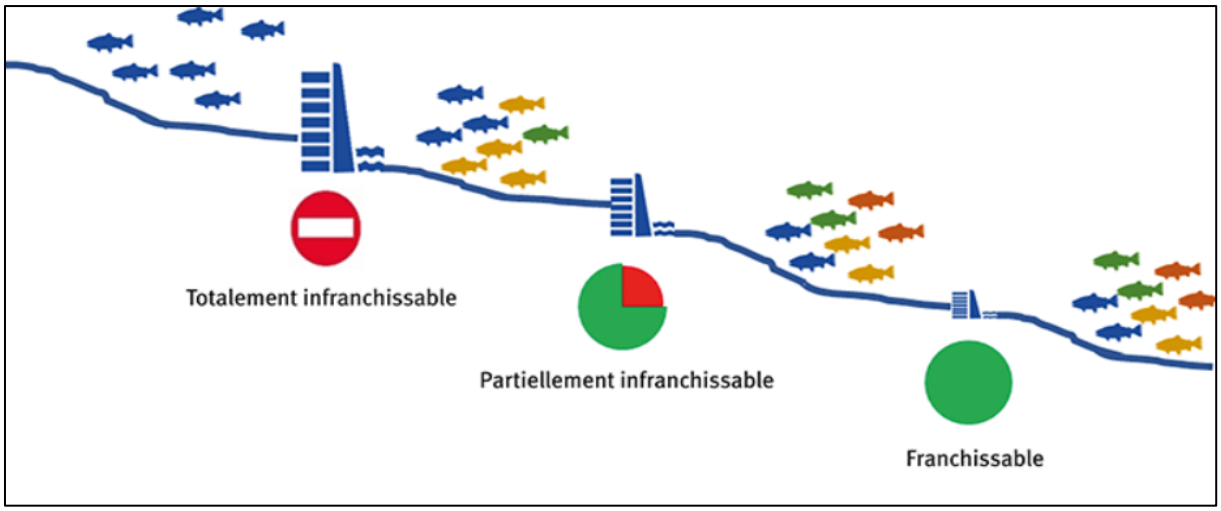


Figure 28 : Schéma illustrant un exemple de fragmentation des habitats aquatiques par des barrières sous forme de barrages ici, engendrant une diminution de la connectivité et de la diversité génétique (couleurs différentes) (Torterotot & Caudron, 2018).

Miles et al. (2019) mettent en avant que les réponses à la fragmentation, c'est-à-dire les flux génétiques entre populations, dépendent de deux traits majeurs : l'adaptation aux conditions urbaines et les modes et capacités de dispersion qui affectent la connectivité.
Par exemple certaines espèces de fourmis forment des populations qui couvrent des paysages entiers (par exemple *Tetramorium immigrans*, Cordonnier et al., 2020) alors que d'autres forment des populations isolées dans des parcelles d'habitat (par exemple *Cataglyphis cursor*, Clémencet et al., 2005).

Pour étudier l'impact de l'urbanisation sur le flux génétique dans les paysages urbains, nous avons utilisé trois espèces de fourmis étroitement apparentées présentes dans un paysage

méditerranéen français. Il s'agit des espèces du genre *Tapinoma* : *T. nigerrimum*, *T. darioi* et *T. madeirense* qui présentent des réponses très différentes aux paysages urbains de la ville de Montpellier (Chapitre 1, Centanni et al., 2022). Cette dernière espèce, proche morphologiquement du complexe, n'en fait pas partie mais du même genre, est très présente sur la zone d'étude et proche de *T. nigerrimum* au niveau de sa structure sociale en fait une espèce comparative.

Chaque espèce présente des traits particuliers : *T. nigerrimum* et *T. madeirense* sont des espèces monodomiques, où les populations comprennent uniquement des colonies à un seul nid. Pour ces espèces, le flux génétique paraît majoritairement assuré par les femelles et les mâles volants. Elles ont également des préférences d'habitat différents. *Tapinoma nigerrimum* préfère les milieux agricoles et de garrigue. Elle évite la plupart du temps les habitats urbanisés (Chapitre 1, Centanni et al., 2022) alors que *Tapinoma madeirense* est indifférente à l'occupation des sols de la zone d'étude (Figure 29). *Tapinoma darioi* est une espèce supercoloniale (Seifert et al., 2017). La supercolonialité est souvent associée à la suppression du vol nuptial (Buczkowski & Bennett, 2008 ; Moffett, 2012), où la dispersion se fait généralement par le biais des activités humaines (Gippet et al., 2019), mais elle peut aussi parfois être assurée par les mâles volants (Passera & Keller, 1994). Seifert et al. (2017) ainsi que Gouraud & Kaufmann (2022) ont d'ailleurs trouvé *Tapinoma darioi* en dehors de la zone méditerranéenne, ce qui montre que le déplacement de cette espèce est probablement lié aux activités humaines. *Tapinoma darioi* est favorisée par la couverture urbaine, mais a également été trouvée dans des habitats de dunes de sable (Chapitre 1, Centanni et al., 2022 ; Seifert et al., 2017).

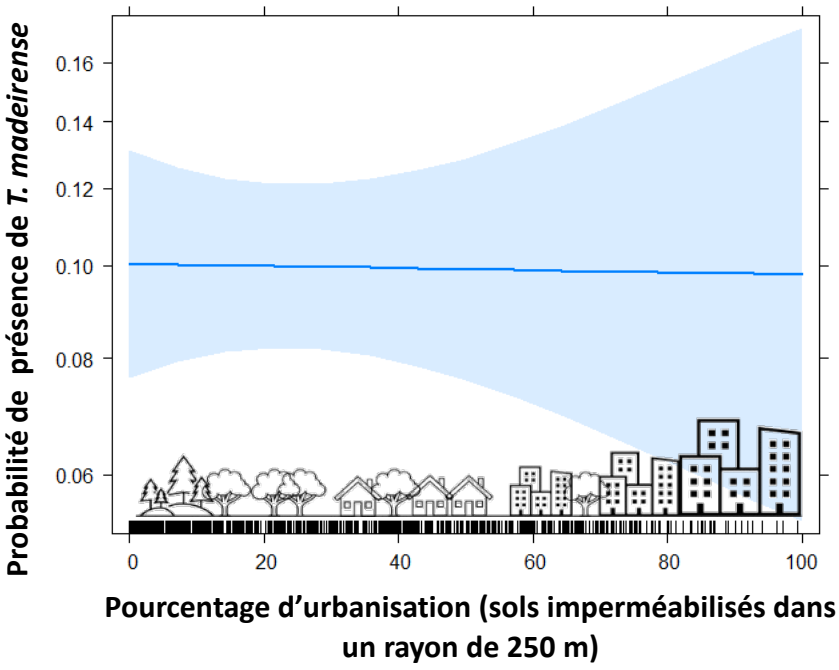


Figure 29 : Probabilités d'occurrence de *Tapinoma madeirense* (modèle linéaire, valeur p=0,947) en fonction du pourcentage d'urbanisation dans un tampon circulaire de 250 m de rayon autour des sites d'échantillonnage.

Les objectifs de la présente étude sont d'examiner comment les paysages urbains affectent le flux de gènes et la structuration génétique chez trois espèces apparentées du genre *Tapinoma*.

Les hypothèses suivantes, concernant la structuration populationnelle pour les trois espèces dans le paysage urbain de Montpellier, ont été testées en utilisant un ensemble de 15 marqueurs microsatellites (Chapitre 1, Centanni et al., 2022).

On s'attend à ce que *Tapinoma madeirense* ait une population continue sans structuration génétique, car elle tolère divers types d'habitats ; que *T. nigerrimum*, sensible à l'urbanisation (Chapitre 1, Centanni et al., 2022), soit structurée par la présence de zones urbaines qui agiraient comme une série de barrières ; et que *Tapinoma darioi*, favorisée par la couverture urbaine (Chapitre 1, Centanni et al., 2022), puisse ne pas avoir de structure spatialement explicite, surtout si elle est dispersée par les activités humaines. De plus, pour cette dernière, la question des origines se pose. En effet, l'origine précise de *T. darioi* n'est pas encore déterminée. Seifert et al. (2017) ont supposé qu'elle était originaire des habitats de dunes de sable le long de la côte méditerranéenne française. Les colonies urbaines de l'espèce pourraient donc s'être dispersées à partir des zones naturelles locales. Pour mieux comprendre les modèles de paysages locaux, nous avons étudié la structuration de la population de *T. darioi* à l'échelle européenne.

L'urbanisation et la fragmentation de l'habitat devraient affecter la consanguinité. La corrélation entre les mesures de consanguinité et la composition du paysage a donc été analysée dans des zones tampons à deux échelles représentant la disponibilité de l'habitat (tampon de 250 m de rayon) et la connectivité (tampon de 500 m de rayon).

Tapinoma nigerrimum devrait être plus isolée dans les zones urbaines, ce qui augmenterait la consanguinité, c'est-à-dire que la consanguinité augmenterait si la connectivité diminue (Miles et al., 2019). Chez *T. madeirense*, qui tolère les villes, aucune corrélation entre la consanguinité et l'urbanisation n'est attendue. Pour *T. darioi*, la diversité génétique dépend du nombre d'individus transportés à chaque épisode de dispersion, ce qui ne conduit à aucune hypothèse claire.

• Matériels et méthodes

▪ Site d'étude, jeu de données et échantillonnage

La plupart des échantillons de fourmis proviennent de Centanni et al. (2022). A partir du paysage étudié dans Centanni et al. (2022) (Chapitre 1) à Montpellier et ses alentours, nous avons étendu notre jeu de données de la péninsule Ibérique à la côte italienne avec quelques points plus au Nord en France à l'aide d'échantillons supplémentaires tirés en partie de nouvelles localités non publiées et de l'étude de Seifert et al. (2017).

Nous nous sommes basés sur les trois espèces de fourmis du genre *Tapinoma* les plus fréquemment rencontrées dans la zone d'étude de Centanni et al. (2022) : *T. nigerrimum*, *T. darioi* et *T. madeirense*.

- **Identifications génétiques**

Un seul individu par nid a été génotypé avec 15 marqueurs microsatellites initialement conçus pour *Tapinoma magnum*. Les détails du développement des microsatellites, des séquences et des amorces et l'identification à l'espèce des individus collectés peuvent être trouvés dans Centanni et al. (2022) (Chapitre 1). Pour *T. darioi* uniquement, nous avons génotypé des individus supplémentaires par nid afin d'améliorer l'assignation des populations introduites à leurs origines locales.

- **Analyses du paysage et génétique des populations**

L'origine des colonies locales a été déduite en utilisant des méthodes de regroupement individuel. Ces méthodes peuvent révéler la présence de barrières ou de zones de flux génétique réduit (Prunier et al., 2013). Nous avons ainsi déterminé le nombre de groupes génétiquement homogènes à partir des données microsatellites avec le logiciel STRUCTURE (Pritchard et al., 2000).

Le meilleur nombre de groupes dans STRUCTURE a été choisi à l'aide de la méthode d'Evanno (Evanno et al., 2005). Le logiciel CLUMPAK regroupe des ensembles d'exécutions STRUCTURE similaires et sépare ces groupes d'exécutions distincts pour générer une solution consensus (Kopelman et al., 2015). Nous avons également calculé les distances génétiques pour évaluer les relations entre les groupes et analyser la matrice de distance obtenue à l'aide d'analyses en coordonnées principales (PCoA).

L'isolement par la distance (IBD) (qui prédit que plus les individus sont éloignés géographiquement, plus ils seront différents génétiquement) a également été estimé afin de fournir une approche alternative au regroupement. Il a été calculé avec Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008), et l'autocorrélation spatiale avec le package R PopGenReports (Gruber & Adamack, 2015).

La consanguinité a été calculée à l'aide du programme COANCESTRY (Wang, 2011).

Nous avons également calculé le pourcentage urbain à l'aide des données paysagères 2015 de l'OCS GE (Occupation du sol à Grande Échelle) Version 1.1 de l'IGN (départements de l'Hérault et du Gard, (https://geoservices.ign.fr/ressources_documentaires/Espace_documentaire/BASES_VECTORIELLES/OCS_GE/DL_OCS_GE_1-1.pdf). Ce pourcentage urbain a été défini dans des zones tampons de rayon de 250 et 500m, à partir de deux classes d'occupation du sol : imperméable construit (CS 1.1.1.1) et imperméable non construit (CS 1.1.1.2). Les surfaces

d'eau (CS 1.2.2) ont été soustraites (voir Chapitre 1 ; Centanni et al., 2022). Les analyses ont été effectuées dans le logiciel QGIS 3.18 (QGIS Development Team, 2019).

Enfin pour étudier l'effet de l'urbanisation, nous avons analysé la corrélation entre la consanguinité et le pourcentage urbain en utilisant un test de corrélation de Spearman pour *T. nigerrimum* et *T. madeirense* (Borcard et al., 2018).

- **Résultats (résumé dans tableau 2)**
  - **Regroupement (Clustering)**

Pour *Tapinoma madeirense* aucun regroupement n'est remarqué. Concernant *T. nigerrimum,* 2 ou 3 groupes sont observés avec de nombreux individus intermédiaires qui sont attribués à ce troisième groupe. Pour *T. darioi*, il y a 6 à 7 groupes distincts avec de très rares individus intermédiaires. L'ensemble de ces résultats est validé par la méthode d'Evanno.

  - **Isolement par la distance, autocorrélation spatiale chez *Tapinoma madeirense* et *T. nigerrimum***

L'isolement par la distance (IBD) est significatif chez *Tapinoma madeirense*, mais beaucoup plus fort chez *T. nigerrimum.* L'autocorrélation spatiale n'est pas significative pour *T. madeirense*, les génotypes sont disposés aléatoirement dans la zone d'échantillonnage. Au contraire, pour *T. nigerrimum*, l'autocorrélation spatiale est significative pour les courtes distances, avec une forte configuration spatiale et un gradient de différenciation est-ouest fort au nord-est de Montpellier. Avec 3 groupes, les individus intermédiaires de *T. nigerrimum* (du groupe 2) sont spatialement regroupés dans une même zone.

  - **Consanguinité et corrélation avec le paysage urbain**

La consanguinité diffère entre les espèces. Pour *Tapinoma nigerrimum* et *T. darioi* l'ensemble de données révèle une consanguinité significative. La moitié des individus de *T. madeirense* ne présente pas de consanguinité.

Il n'y a pas eu de corrélation entre la consanguinité et le paysage urbain (tampon de 250 m et 500 m de rayon) pour *T. madeirense* et *T. nigerrimum*.

  - **La situation complexe de *Tapinoma darioi***

Six groupes génétiques (différenciés par leur couleur) sont détectés pour *Tapinoma darioi.* Ces 6 groupes sont présents à Montpellier et ses alentours proches. A l'échelle européenne, il y a trois grands groupes (Figure 30) :
- Un groupe bleu clair le long de la côte Catalogne
- Un groupe vert dans la partie orientale de la distribution, en Corse, en Sardaigne et sur la côte italienne

- Un groupe bleu foncé en Provence, mais ce groupe est aussi présent au nord de la Catalogne.

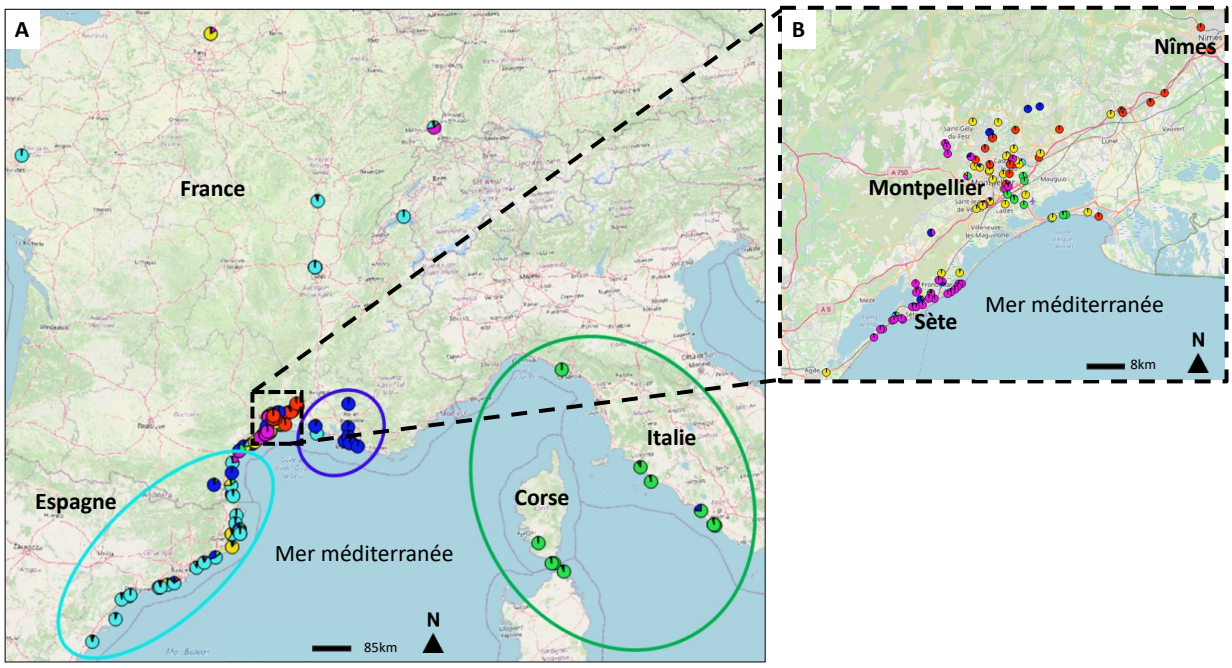


Figure 30 : A) Carte représentant la distribution des différents groupes de *T. darioi* pour 6 groupes définis avec STRUCTURE. Les grands ovales colorés (bleu clair, vert et bleu foncé) entourent les trois groupes géographiquement continus cités plus haut. B) Zoom sur la zone de Montpellier et ses alentours. Fond de carte OpenStreet map.

Pour le groupe jaune, on observe des colonies sur la côte catalane, une au Nord près de Paris et de nombreuses colonies sont repérées aux alentours de Montpellier (Figure 30).

Les colonies représentées par les couleurs rouges violettes sont présentes uniquement vers Montpellier et constituent la majorité des colonies dans notre zone d'étude (Figure 30B).

L'IBD était significatif mais faible à la fois à l'échelle du paysage et à l'échelle globale.

L'autocorrélation spatiale n'était positive et significative que dans les plus petits intervalles de distance, tant pour l'échelle de Montpellier et ses alentours que pour l'échelle européenne.

Tableau 2 : Résumé des résultats obtenus pour les trois espèces étudiées.

	Tapinoma madeirense	***Tapinoma nigerrimum***	***Tapinoma darioi***
Regroupement (groupes génétiquement apparentés)	Aucun regroupement, une seule population	2/3 groupes avec zone d'hybridation	6/7 groupes distincts, pas d'hybridation
IBD (isolement par la distance)	Significatif mais faible	IBD plus fort	Significatif mais faible
Autocorrélation spatiale	Pas d'autocorrélation	Autocorrélation significative pour les courtes distances	Positive et significative uniquement pour les courtes distances
Consanguinité	La moitié des individus non consanguins	Significative	Significative
Corrélation consanguinité/paysage urbain	Pas de corrélation	Pas de corrélation	Non calculée

- **Discussion**

Les objectifs de la présente étude étaient d'étudier comment l'urbanisation à travers la fragmentation du paysage affecte le flux génétique et la structuration génétique chez trois espèces du genre *Tapinoma*.
Nous avons observé des réponses différentes pour les trois espèces étudiées.

Tapinoma madeirense n'a pas montré de regroupement génétique, elle a formé une seule population homogène sur l'ensemble du paysage sans autocorrélation spatiale, avec un IBD limité. Une consanguinité a également été observée. Les populations sont supposées être polygynes ce qui peut conduire à une consanguinité si l'accouplement a lieu à l'intérieur des nids apparentés. Dans cette étude, nous avons également montré que la couverture urbaine n'a pas affecté la dispersion chez *T. madeirense* tout comme elle n'a pas affecté l'occurrence (Figure 29). L'étendue de l'étude pourrait avoir été trop réduite pour générer un IBD. Des mesures de traits liés à la dispersion naturelle, comme la surface des ailes, le volume des muscles thoraciques, nécessitent d'être menées pour comprendre cette répartition (Helms & Kaspari, 2015 ; Seifert et al., 2016).

Tapinoma nigerrimum a montré un regroupement spatial, une autocorrélation et un isolement par la distance. Une consanguinité est également observée. La structure sociale pour cette espèce est actuellement inconnue, étant soit monogyne, soit polygyne comme chez *T. madeirense*, ce qui pourrait expliquer cette consanguinité. Nous avons montré que

l'urbanisation ne semble pas agir comme une barrière entre les groupes. L'absence d'impact urbain sur le regroupement génétique est tout aussi difficile à expliquer. Les effets liés à l'urbanisation ne se sont peut-être pas encore révélés, le temps écoulé depuis l'urbanisation peut avoir été trop court pour que des effets apparaissent. Une zone d'hybridation est observée au nord-est de la zone urbanisée de Montpellier. Elle se trouve entre deux groupes à l'est et à l'ouest dans un habitat naturel de garrigue ouvert au niveau du massif du Devès (Groupe 2 en vert, Figure 31). Un échantillonnage à plus grande échelle est nécessaire pour expliquer ce modèle de regroupement. Ce paysage pourrait être une zone de frontière génétique où les populations orientales (i.e. vallée du Rhône et Provence) et occidentales de *T. nigerrimum* se rencontrent et se mélangent. L'hypothèse que les populations soient structurées par la présence de zones urbaines qui agiraient comme une série de barrières n'a donc pas été validée pour *T. nigerrimum*, les facteurs locaux et probablement historiques semblent avoir plus de poids que l'urbanisation. *Formica Japonica,* similaire à *T. nigerrimum* ou *T. madeirense* dans son organisation sociale, n'a également pas été affectée par l'urbanisation et a montré une dispersion efficace (Yamamoto et al., 2013). Tout comme chez l'espèce de fourmi *Temnothorax nylanderi,* où Khimoun et al. (2020) ont montré qu'elle présentait une dispersion efficace et n'ont pas révélé d'impact de l'urbanisation sur la diversité génétique.

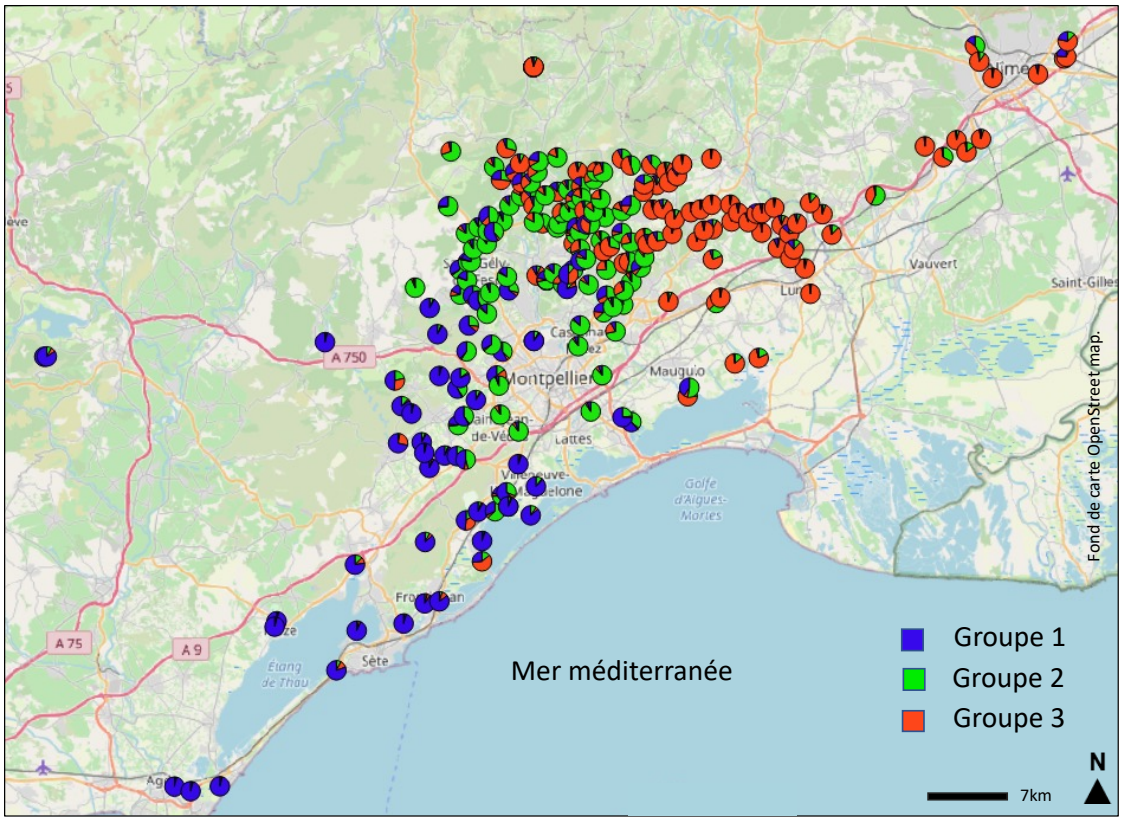


Figure 31 : Carte illustrant la distribution et le regroupement génétique de *Tapinoma nigerrimum* (1 individu par site) à l'aide des données obtenues avec STRUCTURE à 3 groupes.

Chez *Tapinoma darioi*, l'IBD n'était pas significatif et l'autocorrélation s'est avérée positive à la fois à l'échelle du paysage et à l'échelle européenne. Une consanguinité peut être

observée en raison de l'effet Wahlund qui correspond à un excès d'homozygotes en raison de la subdivision de la population en sous-populations qui échangent peu de gènes avec des populations différentes de par l'isolement engendré par des barrières physiques ou géographiques (Zhivotovsky, 2015). C'est ce qui est observé pour *T. darioi* compte tenu de l'étendue spatiale de l'échantillonnage génétique.
Des groupes que l'on trouve en Espagne et en Italie sont observés à Montpellier ainsi que deux groupes probablement locaux, un côtier et un autre plus au Nord de Montpellier. Par conséquent, on observe un mélange de populations locales et potentiellement introduites. Un échantillonnage supplémentaire sur le pourtour méditerranéen serait nécessaire pour confirmer l'origine de *T. darioi.* Le paysage urbain semble donc jouer un rôle dans la dispersion de *T. darioi* à travers les activités humaines notamment par le transport de plantes en pots (Gouraud & Kaufmann, 2022 ; Seifert et al., 2017), de sable, de terre ou de déchets végétaux (racines, feuilles, …).
De plus, la présence de *T. darioi* dans les milieux dunaires sur la côte méditerranéenne révèle peut-être des dispersions très anciennes liées aux premières navigations.

Par comparaison, pour *Tapinoma sessile,* espèce invasive aux Etats-Unis, les activités humaines ont au contraire engendré la création d'une population homogène urbaine (Blumenfeld et al., 2021). Chez une espèce d'arbre invasif *Ailanthus altissima*, Brusa & Holzapfel (2017) ont montré que des échanges génétiques à courtes distances étaient dus aux trafics automobiles.

Concernant *T. darioi*, en Italie et en Catalogne, les colonies ont été trouvées notamment dans les dunes de sable et dans les espaces verts proches du bord de mer. Ces colonies (le groupe jaune et le groupe vert) sont aussi retrouvées à Montpellier et aux alentours proches. Seifert et al. (2017) ou encore Gouraud & Kaufmann (2022) citent les oliviers comme voie de propagation des fourmis *Tapinoma*. Effectivement les plantes méditerranéennes les plus sollicitées par le public sont les oliviers ornementaux (*Olea europaea*), le palmier éventail européen (*Chamaerops humilis*) et les cyprès méditerranéens (*Cupressus sempervirens*). En effet, la zone méditerranéenne abrite de nombreuses espèces végétales locales et introduites. Dans la ville de Montpellier (data.montpellier.3m), le pin ponderosa *Pinus ponderos*, l'ortie *Celtis australis* et le chêne à feuilles persistantes *Quercus ilex* sont des plantes courantes qui sont produites localement ou le long du littoral méditerranéen de l'Espagne, de la France et de l'Italie et ont le potentiel d'accueillir des fourmis *Tapinoma*. Des recherches complémentaires sur les voies d'introduction à longue distance à travers un échantillonnage de fourmis dans les magasins de plantes, ainsi que dans les pépinières seraient donc intéressantes à entreprendre.

***

Le travail qui suit présente l'article détaillé.

2. Compared of genetic structuring patterns of three ant species of the genus *Tapinoma* co-occurring in urban landscape

Julia CENTANNI[1*], Adeline DUMET[2], Olivier BLIGHT[3], Bernhard SEIFERT[4], Massimiliano CENTORAME[5], Pierre JAY-ROBERT[1], Alan VERGNES[1], Bernard KAUFMANN[2]

En préparation

Affiliations :

1 : CEFE, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Univ Paul Valéry Montpellier 3, Montpellier, France.

2 : Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France.

3 : Avignon Université, Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, IMBE, 84000 Avignon, France.

4 : Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz

5 : Department of Biology and Biotechnologies "Charles Darwin"

*Corresponding author: Email: julia-jane.centanni@univ-montp3.fr

Abstract

Urbanization can reduce habitat availability and induce habitat fragmentation, which in turn alters gene flow and genetic diversity of organisms. In a French Mediterranean landscape, we studied the impact of urbanization on genetic structuring in three species of the genus *Tapinoma* with different social, dispersal traits and habitat preference (i.e. *T. nigerrimum* negatively affected by urbanization, *T. darioi* positively affected, and *T. madeirense* unaffected). Using 15 microsatellite markers and an individual-based sampling scheme (number of individual colonies for *T.n*. = 245, *T.m.* = 101, *T.d.* = 101 locally + 68 from whole known distribution), our study showed no clear effect of urban landscape properties on genetic structuring nor on individual inbreeding for *T. madeirense* and *T. nigerrimum*. In the latter, a zone of unexplained steep genetic differentiation was observed in a natural area north of the studied landscape. *Tapinoma darioi* clustered into six genetic groups, two of which appeared native, while four originated from different areas of the Mediterranean coasts of Italy, Spain and France. The urban landscape thus seemed to play a role of invasive hub for *T. darioi* through human-mediated dispersal. This could lead to genetic mixing of local and introduced populations, with unpredictable consequences on the species invasive potential.

Key words: urbanization, genetic structuration, landscape genetics, *Tapinoma darioi*, *Tapinoma nigerrimum*

1. Introduction

Urbanization is a global phenomenon leading to habitat destruction by converting agricultural or natural areas into impermeable surfaces, leading to the creation of novel

habitats with urban-specific characteristics such as compacted soils, high temperatures, light, noise and chemical pollution of air, water and soil (McKinney, 2008; Molina & Molina, 2004; Onodera et al., 2008). This process results in the fragmentation of remaining original and novel habitats by the built-up urban landscape and transport infrastructure (Clergeau, 2007; McKinney & Lockwood, 1999; McKinney, 2006). Its effects spread from dense urban cores to rural fringes through road networks, intensive agriculture, tourist destinations and extractive industries (Clergeau, 2007). The main consequence of urbanization for biological communities and populations is a reduction in overall diversity, with an increase in frequency of exotic or native urban-tolerant species, and a decrease of urban-intolerant species (Heterick et al., 2013; Jokimäki et al., 2016; McKinney, 2006). A second consequence is landscape fragmentation that may result in lower connectivity for most species, leading to geographical isolation, even for exotic and urban-tolerant species (Colyn et al., 2015; Davis et al., 2010; Jha & Kremen, 2013; Munshi-South et al., 2013).

From a population genetics perspective, habitat reduction and fragmentation equate to effective population size, genetic diversity and gene flow being diminished concurrently, with consequences for the survival and evolutionary potential of urban populations (Colyn et al., 2015; Frantz et al., 2009). Miles et al. (2019) reviewed 117 studies on population genetics of species present in urban landscapes. Most studies used landscape genetics approaches using classical population genetics tools. The conclusion that emerges is that the responses of gene flow to urban fragmentation depend on two major biological traits: i) resistance or adaptation to city conditions, which determine occupied patch numbers and population sizes, and ii) dispersal modes and capabilities, which determine the impact of landscape features which affect functional connectivity. Species which resist city conditions and have efficient dispersal therefore remain unaffected while resistant species with inefficient dispersal suffer from diversity loss and either genetic structuring or high viscosity (Miles et al., 2019). Conversely, urban-intolerant (or urbanophobes) species have large non-urban populations for which urban areas can act as barriers unless they have high dispersal capabilities. Finally, true urbanophiles or urban specialists may make up i) isolated inter-urban groups if they are efficient dispersers but do not engage in Human-mediated long distance jumps, ii) intra-urban groups if they are inefficient dispersers, or iii) undifferentiated broadscale urban population if they engage in long-distance human-mediated jumps. From these conclusions, Miles et al. (2019) recommend comparative studies where the model systems comprise i) a single species confronted to different landscapes, ii) phylogenetically close species within a single landscape, or iii) better still, numerous species across different landscapes.

To investigate the impact of urbanization on the gene flow in urban landscapes, the present study proposes comparing genetic structuring patterns in three closely related ant species present in a single French Mediterranean urban landscape. The family Formicidae offers numerous examples of species found in urban areas, (e.g. *Tapinoma sessile*, (Menke et al., 2010), the Argentine ant (Ward et al., 2005) or *Lasius niger* (Gippet et al., 2017)) with diverse

social and ecological characteristics. It also has efficient winged or solely Human-mediated dispersers (Gippet et al., 2017; Ward et al., 2005). Some ant species build dense populations in isolated habitat patches (e.g. Cataglyphis cursor, Clémencet et al., 2005), while others make up continuous populations that blanket whole landscapes landscapes (e.g. *Tetramorium immigrans*, Cordonnier et al., 2020a). Phylogenetically close species can also differ strongly in their habitat preferences (e.g. *Lasius niger* found in rural and urban open habitats vs *L. platythorax* only in woodlands and bogs, Seifert, 2017) as well as their dispersal strategies (e.g. *Lasius neglectus* budding or Human-mediated dispersal vs all other European *Lasius* species by flying gynes, Espadaler et al., 2004).

Here we study three species of the genus *Tapinoma: T. nigerrimum, T. darioi* and *T. madeirense* which feature strongly divergent responses to urban land use in the landscape of the urban area of Montpellier in France (Centanni et al., 2022). Their ecological traits and population genetics hypotheses based on these traits are summarized in Table 1. Mitochondrial DNA data in Seifert et al. (2017) suggest a close, sister-species relationship between *T. nigerrimum* and *T. darioi*. *Tapinoma madeirense* branches outside the *T. nigerrimum* group, and belongs to the related *T. erraticum* group (Seifert et al., 2017). *Tapinoma darioi* is a supercolonial species building up large colonies of hundreds of nests freely exchanging queens, workers and brood, whereas both *T. nigerrimum* and *T. madeirense* are monodomous species, in which populations comprise inter-aggressive single-nest colonies only. Social structures are probably monogynous or oligogynous for *T. nigerrimum* (Seifert et al., 2017) and polygynous for *T. madeirense* (by extension of data on its sister species *T. subboreale*, Seifert, 2018). Supercoloniality is associated with reduction or suppression of nuptial flight, as in *T. sessile* (Buczkowski & Bennett, 2008) or the Argentine ant *Linepithema humile* (Moffett, 2012). In these species, Human-mediated dispersal (HMD, Gippet et al., 2019) is the main or unique dispersal mechanism, although some gene flow could be provided by flying males, which is the case in some invasive species such as in Argentine ants (Passera & Keller, 1994). *Tapinoma darioi* has been documented away from the Mediterranean region, probably imported with potted plants and olive tree transplantation, therefore proving that long distance HMD is possible for the species (Seifert et al., 2017). Monodomous species such as *T. madeirense* and *T. nigerrimum* generally disperse through gynes (alate females) and both males and gynes participate in gene flow (Helms & Kaspari, 2015). The three *Tapinoma* species have divergent habitat requirements in urban landscapes: *Tapinoma nigerrimum* is less observed in urban habitats, and more present in natural or even agricultural land-covers (Centanni et al., 2022). *Tapinoma madeirense* appears indifferent to land-cover in the study area (data shown in SM1). *Tapinoma darioi* is clearly favoured in urban land-cover, but was also found in sand-dune habitats (Centanni et al., 2022) that have been suggested as its natural habitat (Seifert et al., 2017).

Based on Miles et al. (2019), three hypotheses regarding population structuring for all three species in the urban landscape of Montpellier (summarized in Table 1.) were tested using a set of 15 microsatellite markers originally designed for *T. magnum,* another member of the

T. nigerrimum group, present but rare in the Montpellier landscape (Centanni et al., 2022). It is expected that i) *T. madeirense* should have a continuous population with little or no observed structure at the study's scale as it is tolerant of diverse habitat types ii) that *T. nigerrimum,* sensitive to urbanization, could be structured by the presence of urban areas which would act as a series of barriers (Centanni et al., 2022) and that iii) *T. darioi,* favoured by urban land-cover (Centanni et al., 2022) may have no spatially explicit structure at the landscape scale, especially if it is dispersed by human activities.
In *T. darioi*, the question of introduced origins overlaps with the impact of the local landscape, making the situation more complex than in the two other species. For Seifert et al. (2017), *T. darioi* was introduced from unknown origins into Mediterranean Islands and European locations away from the Mediterranean climate zone. It was assumed by the same authors to be native of sand-dune habitats along the French Mediterranean coast. Urban colonies of the species could therefore have dispersed from local natural areas, but also from other locations along the Mediterranean coast. In order to understand local landscape patterns, the global scale population structure of the species was used to inform the landscape scale structure. Based on a dataset of colonies present in Seifert et al. (2017) as well as unpublished new localities, the origin of local colonies was inferred using both individual clustering methods and population genetics distance measures.

As the sampling scheme of the present study was individual and continuous over the landscape, population structure was investigated using a spatial overlay approach of genetic clustering, which can reveal the presence of barriers or zones of reduced gene flow (Prunier et al., 2013). In addition, isolation-by-distance (IBD), which is a common process in continuous populations, was estimated to provide an alternative hypothesis to clustering.

Urbanization and habitat fragmentation should also affect the ability of reproductive individuals to find non-related mates and hence, avoid inbreeding. Miles et al. (2019) based their hypotheses on genetic diversity rather than inbreeding. However, with individual data, the two concepts become very close. Individual inbreeding is estimated by measuring the frequency of homozygous positions at all loci compared to expected frequencies (Wang, 2011). Genetic diversity in individuals from populations not under strong inbreeding can be best-estimated using homozygosity by locus (HL) (Aparicio et al., 2006). The correlation between individual inbreeding measures and landscape composition was therefore analysed in buffer zones at two scales representing habitat availability (250m radius buffer) and structural connectivity (500m radius buffer). *Tapinoma nigerrimum* should therefore be more isolated in urban contexts, which would increase inbreeding (Miles et al., 2019). In the urban-tolerant *T. madeirense* no correlation between inbreeding and landscape measures of urbanization are expected. For *T. darioi*, HMD could lead to strong bottlenecks, depending on the number of reproductive individuals transported at each dispersal episode, therefore decorrelating inbreeding from landscape composition (Table 1), leading to no clear hypothesis.

Table 1. Ecological traits and resulting landscape genetics hypotheses for clustering and inbreeding (HMD: human-mediated dispersal; IBD: isolation-by-distance; monodomous: colony forming only one nest; supercolonial: social structure made up of several colonies of the same species and presenting an absence of intraspecific aggressiveness allowing an exchange of individuals between different nests).

Species				
		T. nigerrimum	*T. darioi*	*T. madeirense*
Response to urban landscapes (Centanni et al., 2022)		**-**	**+**	**0**
Ecological and dispersal related traits	*Colony structure*	**monodomous**	**supercolonial**	**monodomous**
	Hypothesized dispersal mode	**Gyne flight**	**Long or short HMD**	**Gyne flight**
	Hypothesized gene flow mechanism	**Gyne and male flight**	**Male flight or colony mixing after HMD**	**Gyne and male flight**
	Invasiveness	**No**	**invasive outside Mediterranean zone**	**No**
	Origin	**native**	**native?**	**native**
Hypotheses	*Individual Inbreeding*	**Higher for urban colonies**	**No clear hypothesis**	**Equal across landscapes**
	Population structure	**Structuration observed across urban habitat**	**- if HMD only: random spatial position of colonies within clusters - if male gene flow important: gradient caused by IBDif colony mixing: colonies assigned to more than one cluster**	**The flight ability of queens is not known, so it is difficult to predic**
	Non indigenous origins		**- if native: local colonies should cluster genetically together and with other spatially-close colonies - if exotic: local colonies should cluster genetically with distant colonies**	

2. Materials and methods

2.1. Study area, sampling and molecular methods

Local landscape

The studied landscape (Fig.1) is the same as in Centanni et al. (2022) and includes the urban areas of Sète (43°24’ N, 3°42’ E; 90,720 inhabitants), Nîmes (43° 50’ N, 4° 21’ 39” E; 182,000 inhabitants) and Montpellier (43°36’ N, 3°52’ E; 457,839 inhabitants) (INSEE, 2017, 2018). It stretches from the Mediterranean coast north to the foothills of the Massif Central. It includes evergreen oak and stone pine forests in the hills, garrigue (Mediterranean evergreen sclerophyllous shrub vegetation; Chytry et al., 2010), farmland especially in the coastal plains (cereals, vineyards, orchards, pastures), wetlands along the coastal lagoons, sand dunes along the seacoast and urban landcover with a growing population. In 2018, an average population density of 5099 inhabitants / km ² was recorded for Montpellier, 1804 inhabitants / km ² for Sète and 924 inhabitants / km ² for Nimes (INSEE, 2022a, 2022b, 2022c).

Datasets

The biological models of the study are three species of *Tapinoma* ant found by Centanni et al. (2022) in the studied landscape, i.e. *T. nigerrimum* (Nylander, 1856), *T. darioi* Seifert et al., 2017 and *T. madeirense* (Forel, 1895). Most of the sampled colonies were from Centanni et al. (2022) (*Tapinoma nigerrimum*: 197 nests out of 242, *T. madeirense:* 91 nests out of 101 and *T. darioi*: 78 nests out of 101. For this survey, in a 1km² mesh grid, sampling points were semi-randomly positioned using the "random point under the influence of a layer" tool in QGIS (excluding aquatic surfaces), and sampled once from March to July 2019 in dry weather, between 15°C and 30°C which to is highest activity period of most ants and it is optimal for *Tapinoma* (Cerdá et al., 1989; Cerdá et al., 1998). One *Tapinoma* nest was sampled (30 workers) within a radius of 15m around each sampling point (following Gippet et al., 2017) and along four 50m transects (oriented North, South, East, West) when the configuration allowed it. All collected individuals were preserved in 96% ethanol.

Additional samples of *Tapinoma nigerrimum* (45 nests), *T. madeirense* (10 nests) and *T. darioi* (23 nests) were added to Centanni et al. (2022) to constitute landscape datasets. These samples were collected between 2014 and 2019 and some are from (Seifert et al., 2017).

As *Tapinoma darioi* was suspected to be introduced, we genotyped samples from the whole known distribution to constitute a global dataset (68 nests, total 169). Most are from Seifert et al. (2017), and the rest from targeted samplings between 2017 and 2021.

Genetic sampling scheme

For all three species, we used a strict individual-based genetic sampling scheme (Prunier et al., 2013). A single individual per nest was genotyped at 15 microsatellite markers originally designed for *Tapinoma magnum*. Details for the development of the microsatellites, sequences and primers can be found in Centanni et al. (2022) as well as identification to species of collected individuals.

For *Tapinoma darioi* only, to improve assignment of putative introduced populations to their native origins, additional individuals were genotyped for random colonies to produce a dataset of 58 colonies with >3 genotyped individuals (4-96), with an additional subset of 35 colonies with >9 genotyped individuals (9-96).

Molecular procedures

DNA from one individual per colony collected in the field was extracted by grinding each ant in proteinase K (10µL at 15mg/ml) and adding Chelex 7% (150µL), followed by a 2 hours incubation at 55°C and 15min at 90°C to inactivate the proteinase K.

Fifteen microsatellite markers were organised into three genotyping pools run on a 3730xl DNA analyser (Applied Biosystems) by a service provider (GENTYANE, Clermont-Ferrand).
The three PCR mixes had a total volume of 12µl with 1X Master Mix Type-it microsatellite PCR kit (QIAGEN, 206246) and 2µl of extracted DNA with 0.02-0.1 µM Forward primer, 0.04-0.2µM Reverse primer and 0.1-0.2µM tail. All PCRs were run with the same cycle program: 5 min annealing at 95°C, 36 cycles with denaturation (30s) at 95°C, annealing (3min) at 60°C, extension (30s) at 72°C, and a final 30min extension at 60°C. Electrophoregrams were read and interpreted with Genemarker 1.95 (Softgenetics). Species identifications were therefore performed using three methods simultaneously: simple PCA, discriminant PCA (dACP, Jombart, 2008; Jombart, et al., 2010) and GENECLASS 2 (Piry et al., 2004). The identification results were then used as priors in Bayesian analysis (STRUCTURE, Pritchard et al., 2000) for confirmation.

2.2. Landscape and population genetics analyses

Landscape Analysis

We used 2015 landscape data from the OCS GE (Occupation du sol à Grande Echelle) Version 1.1 from IGN (Hérault and Gard départements, (https://geoservices.ign.fr/ressources_documentaires/Espace_documentaire/BASES_VECTORIELLES/OCS_GE/DL_OCS_GE_1-1.pdf). The reference aerial imagery is the BD ORTHO product at 50 cm. The scale of use is 1: 2,500. OCS GE vector files have 14 land-cover classes and 17 land-use classes. Minimal polygon areas are 200 m2 within built-up areas, 500m2 within urban zones, and 2500m2 outside urban zones.

Urban percentage was calculated in buffers at two radius lengths of 250 and 500m. We considered two land cover classes as representative of the urban environment: built

impermeable (CS 1.1.1.1) and unbuilt impermeable (CS 1.1.1.2). Water surfaces (CS 1.2.2) were subtracted. Analyses were performed in QGIS 3.18 software (QGIS Development Team, 2019). QGIS was also used to produce maps of STRUCTURE Q-values (see below).

Basic population genetic statistics

We used the function basic.stats in the R package "hierfstat" version 0.5-11 (Goudet, 2005) to calculate the Ho (observed heterozygosity) and the Hs (expected heterozygosity) and the function nb.alleles to have the exact number of alleles on all individuals (Goudet et al., 2022). Fis (fixation index) was calculated with HWE probability tests in the Genepop package 4.7.5 (Rousset, 2008).

Individual inbreeding

Individual inbreeding was calculated as "LynchRt" with the program COANCESTRY (Wang, 2011). To study the effect of urbanization we analyzed the correlation between inbreeding and urban percentage using a Spearman correlation test (Borcard et al., 2018).

Isolation-by-distance and spatial auto-correlation

Isolation by distance (IBD) was calculated with the Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008), which estimates isolation by distance by regression of genetic distance (Rousset's â) on Ln (geographic distance) between pairs of individuals.

Spatial autocorrelation was calculated with the PopGenReports R package (Gruber & Adamack, 2015), which provides numerous population and spatial genetics utilities. The autocorrelation coefficient r was calculated for each genetic distance pair for all specified distance classes after Smouse & Peakall (1999).

Clustering

To determine the number of genetically homogeneous groups using microsatellite data, we used the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE v.2.3.1 software (Pritchard et al., 2000) and Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC), designed to identify groups of genetically related individuals (DAPC, Jombart, 2008; Jombart et al., 2010; Jombart & Collins, 2015, implemented in the R package adegenet).

The best number of clusters in STRUCTURE (best K) was chosen as in Evanno (Evanno et al., 2005). STRUCTURE cluster assignment was based on 100000 burn-in and 100000 simulations, with 10 runs at each value of K from 1 to 14.
CLUMPAK (Clustering Markov Packager Across K) based on a Markov clustering algorithm that groups set of similar STRUCTURE runs into modes and separates these distinct groups of runs to generate a consensus solution for each distinct mode (Kopelman et al., 2015) was used to generate Q-values (membership proportion at each cluster) for all individuals based on all 10 runs. Q-values were mapped using QGIS 3.18 software.

Genetic distances and PCoA

The hierftstat R package was used to calculate genetic distances using Chord distances (Jombart, 2008). The distance matrix obtained was analysed by a principal coordinate analysis (PCoA) to graphically represent the distance matrix.

All statistical analyses based on R packages were computed using R version 3.6.2 (R Development Core Team, 2019), and RStudio (RStudio Team, 2020).

3. Result

3.1. Clustering

Bayesian clustering results for the three species were highly contrasted (Fig. 1 and 2), with no clear clustering in *Tapinoma madeirense*, the presence of two or three clusters with many intermediate individuals in *T. nigerrimum*, and 6 to 7 distinct clusters in *T. darioi*.

More specifically, in *T. madeirense*, Evanno's best K suggested 2 clusters. However, most individuals had intermediate membership values (Q-values) in one or the other cluster (Fig. 1A), with 85.3 % of individuals having Q-values below 0.7 in any cluster, and a mode at 0.4335 at cluster 1. This is indicative of an absence of clustering.

In *Tapinoma nigerrimum*, Evanno's best K supported 2 or 3 clusters. For K=2, 75.53% of individuals had Q-values >0.7 in one or the other cluster (Fig. 1B), with a mode at 0.9435 at cluster 1. Intermediate individuals (0.3<Q<0.7) made up 24.47% of individuals, therefore showing admixture between clusters. A 3-cluster analysis (Fig. S1) resulted in most intermediate individuals at K=2 being assigned to a third cluster. 31.76% of individuals were intermediate (i.e. with no Q-value >0.7) between the 3 clusters, again showing strong admixture between clusters.

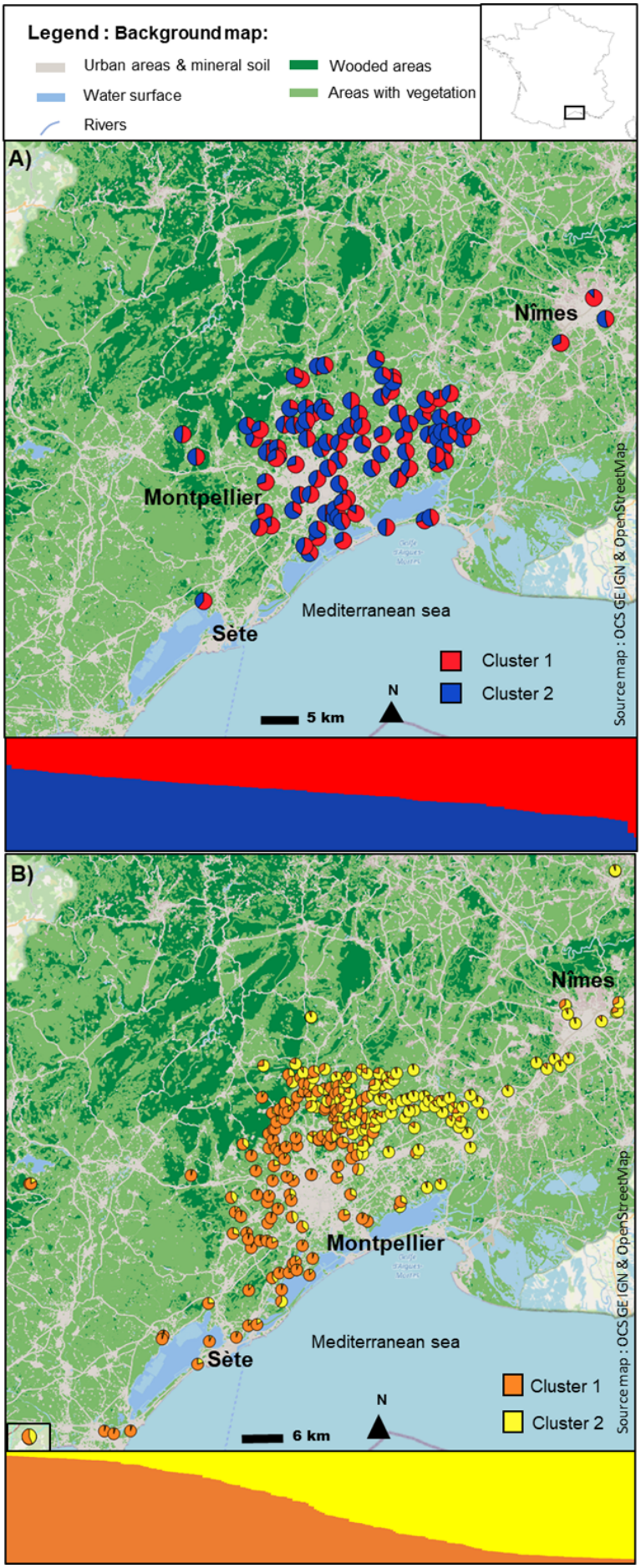

Legend : Background map:
Urban areas & mineral soil
Water surface
Rivers
Wooded areas
Areas with vegetation
A)
Nîmes
Montpellier
Mediterranean sea
Sète
Cluster 1
Cluster 2
N
5 km
Source map : OCS GE IGN & OpenStreetMap
B)
Nîmes
Montpellier
Mediterranean sea
Sète
Cluster 1
Cluster 2
N
6 km
Source map : OCS GE IGN & OpenStreetMap

Figure. 1. Distribution maps and genetic clustering (background legends and position of maps are indicated in upper panel).
A) Distribution map of *T. madeirense* (1 individual per site) showing STRUCTURE Q-values at K=2. Below map: K=2 STRUCTURE diagram of Q-values sorted by values.
B) Distribution map of *T. nigerrimum* (1 individual per site) showing STRUCTURE Q-values at K=2. Below map**:** K=2 STRUCTURE diagram of Q-values sorted by values. Boxed diagram (bottom left) represents nest located at a further 30km south from map edge.

For *Tapinoma darioi*, clustering analysis was extended to colonies from around the western Mediterranean as well as invaded localities north of the Mediterranean zone (Fig. 2B, 2C). Best K estimates from Evanno's method on Structure results as well as DAPC pointed to 6 or 7 clusters. With 6 clusters, both methods converged toward 3 totally identical clusters, and 3 clusters where individuals were mixed-up between methods. With k=7 in Structure, the overall clustering pattern was conserved, adding a 7th cluster subdivideding cluster 4, and placed formerly highly admixed individuals of cluster 6 into cluster 7. DAPC with k=7 converged with Structure at k=6 or 7 more strongly than with k=6 (Fig. 2A). As they seemed to represent a compromise situation, only Structure results with k=6 will be further discussed. Most individuals were clearly assigned to a single cluster (77,5% or 131/169 had Q values >0.9 in a single cluster). Intermediate individuals were uncommon as only 10.06% of individuals (17/169) had Q-values with less than 0.70 in at least one cluster, most of them within clusters 4 (5 individuals) and 6 (6 individuals), or with clusters 4 and 6 as second-highest Q-values (3 individuals). The most admixed individuals, i.e. with Q-values more equally spread over more clusters, were an individual from Saint-Pierre-La-Mer (France, near Narbonne) with near equal Q-values into cluster 1, 3 and 6 (resp. Q=0.29, 0.35 and 0.27) and another from l'Estartit (Spain, north Catalonia) with cluster 1, 4, 5 and 6 (resp. Q= 0.1505, 0.12, 0.2842 and 0.4065).

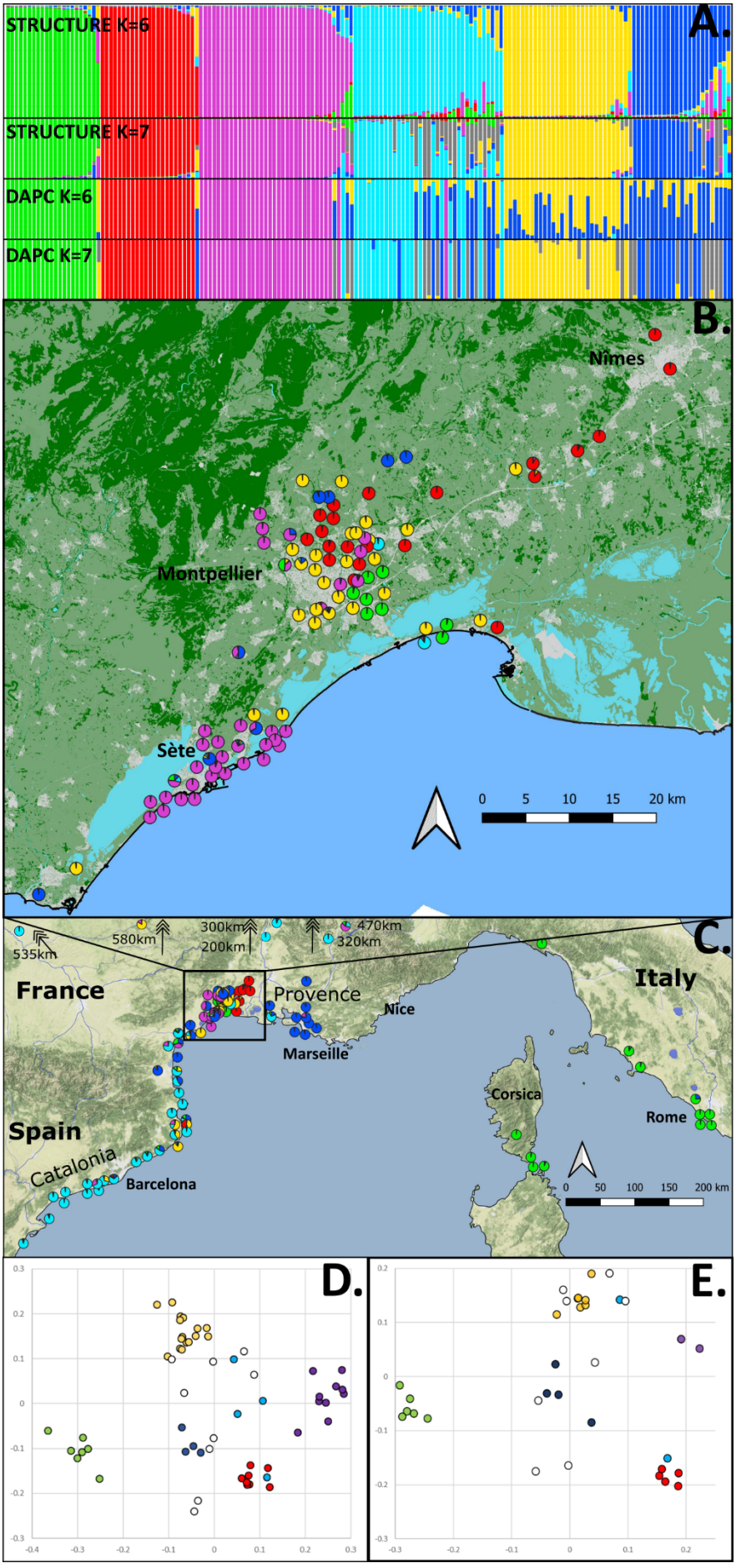

A.
STRUCTURE K=6
STRUCTURE K=7
DAPC K=6
DAPC K=7
B.
Nîmes
Montpellier
Sète
0 5 10 15 20 km
C.
535km
580km
300km
200km
470km
320km
France
Provence
Nice
Marseille
Italy
Corsica
Rome
Spain
Catalonia
Barcelona
0 50 100 150 200 km
D.
E.

Figure 2. Clustering, spatial distribution of clusters and genetic distances between clusters for *T. darioi*.
A. Individual Q-values for k=6 and k=7 clusters defined with Structure, individual probabilities of membership for k=6 and k=7 clusters defined by DAPC. Order from left to right by Q-values at each cluster defined by Structure with k=6.
B. Spatial distribution of individuals in the Montpellier area, showing individual Q values for k=6 clusters defined with Structure. Map background from IGN, dark green is forest, light green open and agricultural habitat, light grey is urban areas and mineral soil.
C. Spatial distribution of individuals along the North-Western Mediterranean coast, showing individual Q values for k=6 clusters defined with Structure. Note that 6 individuals originated from areas North of the map; arrows indicate direction and figures distances in km for each of these individuals. Map background from Stamen Terrain, with darker greens for higher altitudes.
D. PCoA of pairwise genetic distances between the 58 colonies where at least 4 individuals have been genotyped, axes 1-2
E. PCoA of pairwise genetic distances between the 35 colonies where at least 10 individuals have been genotyped, axes 1-2
Colors match the k=6 clusters obtained with Structure: cluster 1 = green, cluster 2 = red, cluster 3 = purple, cluster 4 = blue, cluster 5 = yellow, cluster 6 = dark blue. White dots in panels D and E = colonies with admixed individuals (max Q value at any cluster<0.8).

3.2. Isolation-by-distance, spatial autocorrelation and spatial overlay of genetic clusters in *Tapinoma madeirense* and *T. nigerrimum*

Isolation by distance (IBD) using Log (distance in meters) was significant in *Tapinoma madeirense* (ABC slope of regression = 0.0426 with bootstrap 95% confidence interval [0.0217 – 0.0847], Fig. S3), but much stronger in *T. nigerrimum* (ABC slope of regression = 0.1242 with bootstrap 95% confidence interval [0.0743 – 0.1810], Fig. S4). Spatial autocorrelation was not significant at any distance class for *T. madeirense* (Fig. 3A), indicating a regular and diffuse IBD, and genotypes (here represented by their Q-values, Fig. S2) were randomly distributed in the sampling area (Fig. 1A). In contrast, for *T. nigerrimum,* where spatial autocorrelation was significant at the 3 smaller distance classes (Fig. 3B), clusters (at k=2 and k=3) showed strong spatial patterning, with an east-west differentiation gradient exhibiting a steeper slope north-east of Montpellier (Fig. 1B). For k=3, individuals belonging to cluster 3 were spatially clustered in that same area of steep k=2 gradient (Fig. S1).

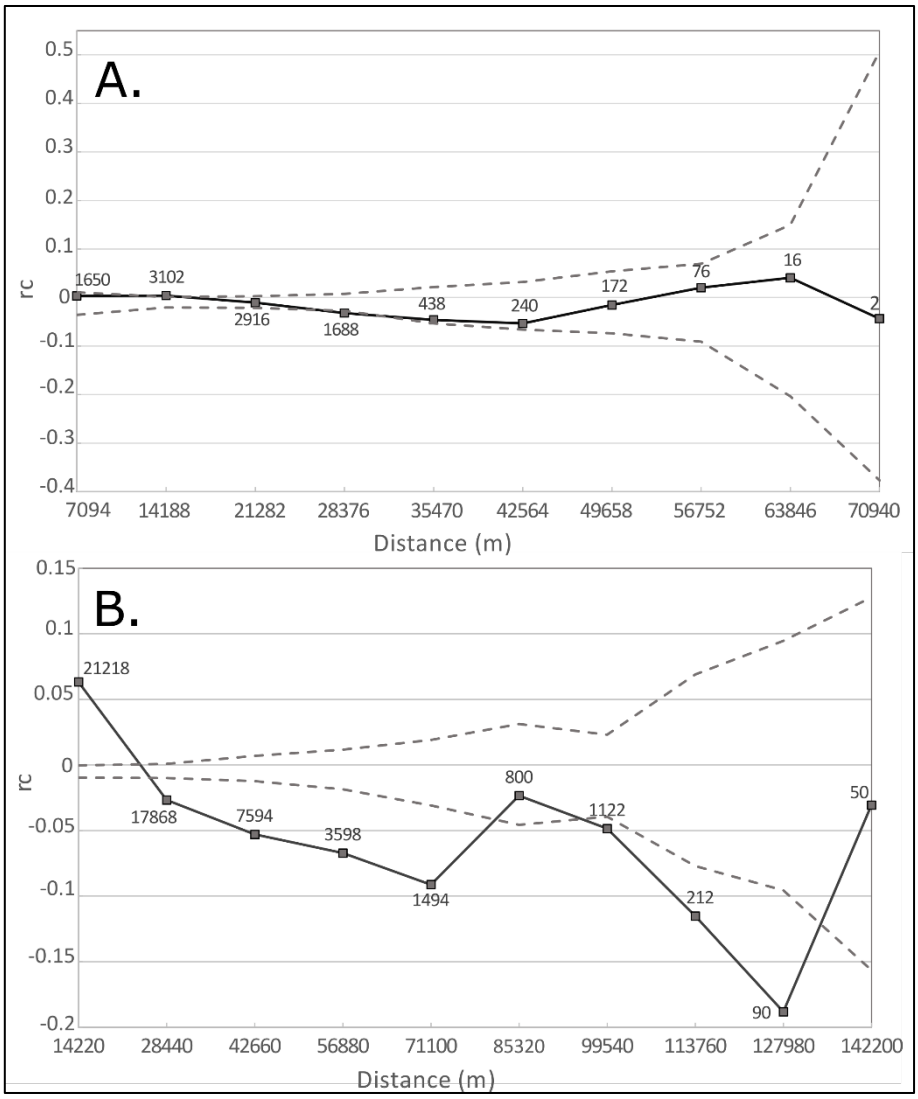


Figure 3. Spatial genetic autocorrelation. *x axis* = distance bins in meters, *y axis* = the value of rc*, dashed lines* = lower and upper 95% confidence interval, *full line* = autocorrelation coefficient rc mean, *numbers above markers* = number of distance pairs in distance bins. **A.** *T. madeirense*, **B.** *T. nigerrimum*.

3.3. Inbreeding patterns

As for clustering, inbreeding patterns differed between species (Table S1, S2 and S3). F_{is} values for the complete datasets revealed significant inbreeding at all or most loci in *Tapinoma nigerrimum* (12/14 polymorphic loci, Table S2) and *T. darioi* (14/14 polymorphic loci, Table S3), which is expected under strong population structuring. The pattern was less pronounced in *T. madeirense* (8/14 polymorphic loci). Individual inbreeding estimates in *T. madeirense* (Table S4) and *T. nigerrimum* (Table S5) varied widely (respectively mean F 0.0710 [-0.1197 to 0.9348] and 0.1965 [-0.1281 to 0.6525] with broad confidence intervals (mean 95% confidence interval size was 0.4169 in *T. madeirense,* and 0.7805 in *T. nigerrimum*). Most *T. madeirense* individuals were not inbred (77,45% with F<0.1), however nearly half *T. nigerrimum* were (50.21% with F<0.1). Individual inbreeding estimates showed

no correlation with landscape values of imperviousness (buffer sizes of 250m and 500m radius) in both *T. madeirense* (Fig. S5) and *T. nigerrimum* (Fig. S6).

3.4. The complex situation in *Tapinoma darioi*

The situation in *Tapinoma darioi* was more complex and, as the species is invasive in part of its range, a broader geographic perspective was needed. All 6 clusters (named here by number and color for clarity) detected in the whole Western Mediterranean and invaded zones to the North were present in the Montpellier area. At the broader scale, there were three significant geographically continuous clusters (Fig. 2C):

- C4-blue in Catalonia, from Benicarlo to slightly North of the French border (350 km across); most colonies from the North of the Mediterranean area belong to this cluster
- C1-green in the Eastern part of the distribution (Corsica, Sardinia, the Italian coast from Rome to Pisa)
- C6-darkblue in Provence, but also present north of Catalonia and on the western French Mediterranean coast
-

C5-yellow was a small isolate of 4 admixed colonies on the Catalonian coast. One introduced colony in the North, near Paris, belonged to this isolate.

In the studied landscape (Fig. 2B), two additional clusters (C2-red and C3-purple) were present and comprised a majority of colonies. C3-purple was the most common with a near continuous distribution along the coast near Sète, and additional colonies dispersed throughout Montpellier and its immediate surroundings. C2-red was mostly present in Montpellier and was most abundant in the Northeast of the urban area. C5-yellow was also abundant in Montpellier and in urbanized areas near the coast. C1-green was mostly present in the Southeast of the urban area, as well as on the coast. C6-darkblue was less common, with four colonies in the hills north of the city of Montpellier, and three on or near the coast. C4-blue was rare, with only two colonies, one in the city, and the other on the coast. To summarize, the only cluster showing strong spatial structuring at the landscape scale was C3-purple with most colonies strung along the coast near Sète.

Strongly admixed genotypes were mostly located between the smaller Catalonian C5-yellow and Sète. Other highly admixed cases were one admixed individual in the area of C3-purple, with Q3=0.4708, Q1=0.2368, Q4=0.1662, Q6=0.1111, and an individual in the North near Mulhouse (France, Q1=0.1348, Q3=0.5843, Q4=0.238).

To evaluate the relationships between clusters, we estimated Chord-distances between populations, using two overlapping datasets comprised of samples with N=4 per colony (Fig. 2D) or with >9 individuals per colony (Fig. 2E, 10-96 individuals per colony). Cluster assignment was based on the 1-individual dataset used above with K=6. Chord-distance

matrices were analyzed by PCoA and projected on three axes (for axes 1-3, see Fig. S7). Both datasets confirmed clustering results, with C1-green, C2-red and C3-purple being well defined and apart from the other clusters, which appeared more related to each other. Highly admixed colonies clustered with C4-blue and C6-darkblue, and to C5-yellow to a lesser degree. C4-blue colonies appeared spread out on Axis 2, but were close to each other on Axis 3 (Fig. S7).

IBD was significant but low at both landscape and global scales (ABC slope of regression b = 0.0698 with bootstrap 95% confidence interval [0.0097 – 0.1254], and b = 0.0806 [0.0352 - 0.1436] respectively). Spatial autocorrelation was positive and significant only at the smallest distance bins for landscape and global scales both (Fig. S8), which is due to clustering over small distances at both scales.

4. Discussion

The objectives of the present study were to investigate how landscapes urbanization, with its consequences on habitat availability and fragmentation, affects gene flow and diversity in three related species of the ant genus *Tapinoma*, especially regarding spatial clustering. All genetic evidence point to very different responses at the landscape scale: *Tapinoma madeirense* showed weak isolation by distance, no genetic clustering nor spatial autocorrelation, while *T. nigerrimum* exhibited stronger isolation by distance, as well as spatial clustering and significant short-distance autocorrelation, with a restricted spatial area of steep genetic change. In both species, individual inbreeding was uncorrelated to landscape composition. Spatial clustering in *T. darioi* was partial at landscape scale, but very strong at continental scale. Clusters from Spain, Italy and the French eastern Mediterranean coast were all present in Montpellier, as well as two seemingly local clusters, one mostly coastal, the second mostly located North-east from Montpellier. This situation indicates that at the landscape scale, there was a mix of local and introduced populations of *T. darioi*, with few intermediate genotypes. The urbanized andscape therefore appears as an invasive hub for *T. darioi.*

4.1. Inbreeding

Hypotheses posed in Table 1 were mostly validated by the genetic evidence. However, inbreeding, at individual and population levels, showed unexpected trends. Population level departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE; i.e. inbreeding sensu lato) was significantly higher than zero at all polymorphic loci in *Tapinoma nigerrimum* and *T. darioi,* and at half of them in *T. madeirense*. Stronger clustering in the first two species should lead to significant apparent inbreeding, due to Wahlund effect (Zhivotovsky, 2015), this being especially true in *T. darioi* considering the spatial extent of the genetic sampling. This is confirmed by measuring inbreeding on colony samples with >9 individuals, which shows no significant departure from HWE, except for marker F12 in L'Estartit. Other potential contributions to significant inbreeding include true inbreeding (i.e. mating between related

individuals) and genotyping biases such as null alleles. The latter bias is often complex to disentangle from other forms of inbreeding (Chybicki & Burczyk, 2009, propose a method to account for inbreeding, but do not discuss Wahlund effects), but should not affect all loci simultaneously, making true inbreeding possible. In *T. madeirense,* colonies are supposed to be polygynous over several generations (by extension of data on its sister-species *T. subboreale*, Seifert et al., 2017), which might lead to inbreeding if mating occurs within nests between related males and females. In *T. nigerrimum*, colony social structure is currently unknown, being either monogynous or weakly polygynous as in *T. madeirense*, in which case true inbreeding might occur as well.

At individual level, no correlation between inbreeding and landscape was found in *T. madeirense* and *T. nigerrimum*. We had hypothesized that urban landscapes, being fragmented for species like *T. nigerrimum,* would lead to mating between nests in close proximity, therefore leading to individual inbreeding over few generations. For *T. madeirense,* which is not impacted by urban landscapes properties, no such individual inbreeding was expected.

4.2. Population structure: clustering, IBD and spatial autocorrelation in *Tapinoma madeirense* and *T. nigerrimum*

Tapinoma madeirense formed a single homogeneous population over the whole landscape, without spatial autocorrelation, and with limited IBD. This validates the idea that the studied landscape does not affect dispersal in *T. madeirense*, just as it does not affect occurrence. It also means that the extent of the study (60x30km rectangle) might have been too small for clear IBD, and conversely, that natural dispersal in *T. madeirense* could occur at a broader scale. This is partly unexpected, as *T. madeirense* is a species with polygynous colonies and small gynes (cephalic size, i.e. mean of head width and head length, is 897 ± 19µm compared to *T. nigerrimum* 1238 ± 1µm, (Seifert, 2012)) both traits that are often opposed to efficient dispersal (Helms, 2018). However, dispersal in ants also depends on other characters such as wing surface, thoracic muscles volume and drag produced by gaster weight, the latter varying with founding strategy (Helms & Kaspari, 2015). Additionally, gene dispersal is also determined by male flight morphology, for which there is little useful data. Only mesosoma lengths have been measured in *T. madeirense* (1455µm (Seifert, 2012)) and the larger *T. darioi* (1768µm (Seifert et al., 2016)) whose males are similar in size to *T. nigerrimum* (for which there is no published data), weakly hinting at shorter dispersal distances for *T. madeirense*. Finally, while there is no suggestion of this in the literature and that no T. madeirense colony has ever been found outside of the Mediterranean region, it remains plausible that T. madeirense could also be dispersed by HMD, which would confuse IBD patterns.

Both gyne and male sizes, as well as social structure, should thus make *Tapinoma nigerrimum* the most efficient disperser of the two species. However, as expected from

landscape preferences, *T. nigerrimum* exhibited clustering, significant autocorrelation and isolation by distance. It was hypothesized that urban land-cover could constitute barriers or at least a resistant matrix to dispersal in *T. nigerrimum*. The observed pattern of clustering, i.e. either two east-west or three east-center-west clusters, is mirrored by very strong autocorrelation at short distances (first bin 0-14220m), and significant negative autocorrelation at larger distances (14220-71100m, 95540-127980), either because IBD acts at very short distances or because of strong clustering.

Spatially overlaying cluster membership with the urbanization map shows that built-up land-cover does not seem to act as a barrier between clusters. Indeed, a two-cluster hypothesis leads to a hybridizing zone which is mostly natural between an eastern and a western cluster. With three clusters, the extra cluster was located in the admixture area. It is northeast of the urbanized area of Montpellier, along a complex non-urbanized landscape of hills and ravines covered with an open garrigue habitat which form a 20km long discontinuous line. It is not a barrier in the sense that *T. nigerrimum* is as common in this area as in neighboring agricultural or garrigue areas. Eastern and western clusters extend away from the contact zone at long distances, indicating that dispersal and connectivity are high within clusters. In this context, dispersal capabilities of *T. nigerrimum* are difficult to assess, because on the one hand clusters are divided by borders indicative of limited dispersal or mixing, on the other, clusters are spread over large distances. Adding complexity to this unclear pattern, the rapid growth of the Montpellier urban zone over the last 60 years has extirpated *T. nigerrimum* from a near continuous extent, leaving a hole in our sampling scheme. The seeming absence of urban impact on genetic clustering is just as difficult to explain. Time since urbanization may have been too short for effects to appear, as ant colonies are often long-lived, especially when they are polygynous, which might be the case in *T. nigerrimum*. Population sizes might also be large, which would also slow differentiation (as in Prunier et al., 2013). There is however no available data on the social system of *T. nigerrimum* or its population sizes.

To summarize, starting hypotheses on clustering, IBD and autocorrelation have therefore not been validated for *T. nigerrimum,* as local and probably historical factors seemed to carry more weight than urbanization.

4.3. Population structure and origins in *Tapinoma darioi*

As clustering was very strong and mostly free of spatial structuring, IBD was not significant and auto-correlation at both landscape and global scales was respectively positive and significant only in the shorter distance classes (Fig. S8). This part of the discussion will therefore focus on clustering results and relationships between clusters, from the landscape to the global scale. As the 7-clusters hypothesis is very close to the 6-clusters hypothesis, only the latter is discussed.

Sources of bias for clustering exist, especially when integrating two very different scales. Clustering depends on the number of individuals sampled per cluster as well as genetic differences between clusters (Puechmaille, 2016). Some global clusters might have remained undetected because of relative or complete lack of samples, leading to apparent admixture. PCoAs of genetic distances, both with 4 individuals or >9 individuals per population, recovered clusters very well, except for C4-blue. Heavily admixed colonies from this cluster might belong to an under-sampled cluster (e.g. Saint-Pierre-la-Mer and Valras colonies): these were identified in Seifert et al. (2016) as *T. magnum* by mtDNA and *T. darioi* by numeric morphology based taxonomy (NUMOBAT, Seifert et al., 2017). They were clearly identified as *T. darioi,* without hybridization, by microsatellite genotyping as described in Centanni et al. (2022). However, low-level introgression by *T. magnum* might still be possible, which would explain clustering inconsistencies and admixed Q-values. C4-blue also seems related to C6-darkblue, as shown by assignment differences between Structure and DAPC as well as proximity on the three axes of the PCoA.

Aside from these details, the spatial overlay of clusters shows that all the global variation in *T. darioi* is at once present and spread out within the studied landscape. While there is arguably some weak spatial clustering (as indicated by significant short-distance autocorrelation), no clear pattern emerged except the presence of a continuous C3-purple group of colonies on the coast near Sète, and a concentration of C2-red colonies in the North-East. Apart from these two genetic clusters, all others showed no spatial signal at the landscape scale. As hypothesized, this pattern strongly suggests at human-mediated dispersal.

Regarding the origins of colonies at the global scale, 3 genetic clusters corresponded to broad geographic ranges:

- C4-blue, dominant along the Catalonian coast was also the most present in the localities North of the Mediterranean zone where it is clearly exotic,
- C1-green, present in the Eastern part of the species distribution, namely mainland Italy, Sardinia and Corsica. It could be native or introduced in the Mediterranean Islands,
- C6-darkblue concentrated along the French eastern Mediterranean coastline of Provence, but was also found further west where it alternated with C4-blue along the coast. This pattern might indicate human-mediated dispersal into the western French Mediterranean from either Catalonia or Provence.
- C5-yellow was only found in closely located sites in Catalonia, where it was surrounded by C4-blue.

The most remarkable feature of *Tapinoma darioi* in the studied landscape was that colonies from these clearly non-local clusters coexisted with possible local colonies from C3-purple and C2-red. This could also mean that transport of local colonies from the coast into the urban area by short-distance HMD had occurred.

What was also remarkable was the lack of strongly admixed colonies: only four were detected (the local C3-purple with introduced C6-darkblue (2), C1-green (1) and C1 and C4). Two nonexclusive hypotheses could explain this surprinsingly low admixture result: (i) insufficient time or (ii) not enough genetic exchange between colonies due to limited flight of males and reciprocal exclusion of workers and gynes from different genetic clusters. In the first case, introduced colonies would constitute direct propagules from their area of origin. In the second, colonies would act as isolated genetic populations, which might disperse without human intervention, by continuous expansion and budding, as in other supercolonial ants such as Argentine ants (Suarez et al., 2001) or *Lasius neglectus* (Espadaler et al., 2007). Secondary dispersal by flying gynes capable of founding colonies cannot be excluded, as is the case in *Tapinoma sessile*, which produces flying gynes while exhibiting supercolonial social structure in urban contexts (Blumenfeld et al., 2021). This would result, given enough time, in geographic clustering of genetic clusters. The presence of some admixed colonies would plead however for the time-lag hypothesis, with mixing allowed either by flying males or colony fusion, two processes present in other supercolonial ants such as Argentine ants (Passera & Keller, 1994; Vásquez et al., 2012).

While reconstructing invasion routes (in the sense of Estoup & Guillemaud, 2010) is outside the bounds of the present paper, defining which colonies are introduced and which are native is here shown to be possible by combining genetic and geographic clustering (e.g. C1-green for Italy, C4-blue for Catalonia and C3-purple for the studied landscape). However, genetic and geographic clustering of native colonies should also correspond to sand dune habitat, which is thought to be the main native habitat type (Seifert et al., 2016) of *T. darioi*. This was true for every cluster in their hypothesized native range, except for C6-darkblue and C2-red. C6-darkblue was found mostly on the Mediterranean coast in French Provence, but also occurred along the western French coast and Catalonia, and was often admixed with C4-blue and C5-yellow. However, it was collected from sand-dune habitats only in the western part of its distribution, raising questions about its origins. The French and Italian Riviera have not been investigated as well as the Catalonian coast. Our own unpublished data revealed the presence of *T. magnum* on beaches up to 100km east of Marseille but not *T. darioi*. Further east in Italy, a colony of *T. magnum* was found near Savona (300 km from Marseille, *T. magnum*) and two colonies of *T. darioi*, one near La Spezia (400 km from Marseille, C1-green), and one at Grosseto (600 km from Marseille, C1-green). This very wide geographic gap between the C6-darkblue and C1-green samples makes it difficult to conclude on the exact origins of C6-darkblue. Adding to this difficulty is the genetic proximity of C6-darkblue to the Catalonian C4-blue and C5-yellow, which could point to a Catalonian origin. C2-red is also problematic: although it was present nearly only in the studied landscape (21 occurrences, plus one strongly admixed colony in Catalonia), it was only found once in sand-dune habitat. It would be prudent not to conclude about its origins without

further sampling. Hence, for the studied landscape, only one cluster, C3-purple, seems definitively native, while all or most others could have been introduced.

Additionally, correspondence between sand-dune habitats, genetic and geographic clustering might not make up enough evidence to qualify nativeness. In most of the region's coastal areas, urbanization and tourism have induced radical land-use and land-cover changes, turning natural sand-dune habitat into resorts, suburbs and industrial complexes (Pinto & Garcia-Lozano, 2016 for Catalonia). Dunes were also subjected to erosion due to increased climate variability and major landscape changes such as the building of new harbours and seawalls, river channelization and redirection. More recently, ecological dune restoration and re-creation further muddled spatial habitat patterns.

Hence, major geographic changes at both landscape and global scale make the observed patterns difficult to interpret. Introduction and dispersal processes, i.e. long-distance introductions vectors and routes (Hulme, 2009), a well as short-distance human-mediated dispersal (Gippet et al., 2019) leading to these observed patterns add to the difficulty. The transport of Mediterranean ornamental plants, from production areas such as Catalonia and Italy is the most likely human activity involved in long-distance dispersal (i.e. introduction from native to invaded area) of invasive *Tapinoma* species (Seifert et al., 2016). In Catalonia and Italy, colonies were mostly searched for and found in coastal natural or beach resort contexts, especially in sand-dunes and greenspaces close to the seashore. Colonies from Catalan C5-yellow and C1-green from Italy are numerous in the studied landscape, and C4-blue is common in invasive localities north of the Mediterranean area. The Mediterranean plants in the studied landscape most sold to the public are ornamental olive trees (*Olea europaea*), Mediterranean cypresses (*Cupressus sempervirens*) and European fan palm (*Chamaerops humilis*). Olive trees imported north of the Mediterranean zone have been cited as the main conduit for introduction of *Tapinoma* ants (Seifert et al., 2017). In the Mediterranean zone, the situation is bound to be more complex, as more tree species are grown close to coastal sandy habitats and planted in diverse contexts such as public parks, curbside planting, sand dune management or ecological restoration. Most of these trees are produced locally or along the Mediterranean coastline of Spain, France and Italy, with the potential to host *Tapinoma* ants in the soil young trees are grown in and transported with.

Measuring the parts of primary introductions and secondary dispersal in such a complex and dynamic system is therefore clearly impossible with the present dataset. More genetic information is needed to trace kinship between colonies and better measure admixture within colonies, either by sampling more individuals per colony or by using genetic markers yielding more information such RADseq, Poolseq or low-coverage whole genome sequencing (Lou et al., 2021).

The present study has clearly shown that the urbanized landscape studied acts as an invasion hub (Cadotte et al., 2017) for *Tapinoma darioi* imported from most of its distribution range, along with providing additional habitat for its local populations. The occurrence, albeit less frequent, of two others closely related introduced species in the same landscape, (i.e. *T. magnum* and *T. ibericum,* Centanni et al., 2022) strengthens that conclusion.

Miles et al. (2019) proposed comparing species with different ecological responses to urbanization to evaluate how gene flow and genetic structure are impacted by urbanization of landscapes. Their predictions that urban avoiders would face reductions in gene flow across urban landscapes could not be validated in *Tapinoma nigerrimum*, due to pre-existing structure, large population or time-lag. The complex situation in *T. darioi*, an urban tolerant species, but where local and introduced populations mingle in the studied landscape, also prevented testing hypotheses of Miles et al (2019). The same authors suggested that concurrently with comparing different species, comparing independent landscapes might allow stronger tests for urban effects on gene flow. For *T. madeirense* and *T. nigerrimum,* replicating the present study to other Mediterranean cities using a spatially continuous sampling scheme would allow better estimation of IBD and autocorrelation at broader scales, but also between various habitat types. It would also better help explain population structures that are difficult to tie to specific land-cover, as was observed in *T. nigerrimum*. As already explained above, for *T. darioi,* a number of questions would need answering before replication became relevant.

Invasive ants have generated a large number of population genetic studies, ever since the seminal work by Ross & Trager (1990) on *Solenopsis* fire ants. Few studies however have investigated urban ant genetics and each used sampling schemes or biological models with species traits that make comparisons with the present study impossible (e.g. Yamamoto et al. 2013, Khimoun et al. 2020, Cordonnier et al. 2019a, 2019b, 2020a). Blumenfeld et al. (2021) showed that in the North American Tapinoma sessile different East coast city populations were genetically closer to each other than to neighboring rural populations, which the authors tie to long-distance HMD, a situation that is clearly different from our three species.

Conclusion

The present study sought to generate comparative datasets between sympatric, closely related species to provide tests for general predictions based on Miles et al. (2019) and adapted to the local landscape and biological models. In brief, it confirms that gene flow and diversity are not affected by the properties of urban landscapes for urban tolerant species such as *Tapinoma madeirense*, and that genetic structures pre-dating urbanization might blur any impact, as in *T. nigerrimum*. In *T. darioi*, long distance HMD did not result in a homogeneous urban population, as in *T. sessile* (Blumenfeld et al., 2021), but in a mix of supercolonies of differing origins, including local, coexisting and maybe starting to exchange

genes, through male propagules. Its invasive pattern is very different from other invasive ant species with supercolonial social organization. For instance, *Lasius neglectus* is thought to have been brought only once to Western Europe (Ugelvig et al., 2008) and the Argentine ant only twice (Giraud et al., 2002), in both cases with further dispersal by secondary HMD. *Nylanderia fulva* is identical in all its known invasive range, with reduced diversity compared to the native range (Eyer et al., 2018). Repeated introductions of *T. darioi* from its native areas may be due to the studied landscape being located within the distribution range of the species, and most long-distance jumps that could produce the observed pattern being smaller than 1000 km. This would allow for high probabilities of propagules (i.e. colony fragments) succeeding both at displacement and establishment. The role of the urbanization of landscape as an invasion hub is here evident (Cadotte et al., 2017). For *T. darioi,* the introduction and mixing process is therefore only beginning, with unpredictable evolutionary outcomes.

References

Aparicio JM, Ortego J, Cordero PJ (2006) What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? Molecular Ecology ; 15 (14):4659-65. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03111.x. PMID: 17107491.

Blumenfeld AJ, Eyer P, Helms AM, Buczkowski G, Vargo EL (2021) Consistent signatures of urban adaptation in a native, urban invader ant *Tapinoma sessile*. Molecular Ecology mec.16188.

Borcard D, Gillet F, Legendre P (2018) Introduction. In: Numerical Ecology with R. Use R!. Springer, Cham. pp 1–9 https://doi.org/10.1007/978-3-319-71404-2_1

Buczkowski G & Bennett G (2008) Seasonal polydomy in a polygynous supercolony of the odorous house ant, *Tapinoma sessile*. Ecological Entomology 33:780–788. https://doi.org/10.1111/J.1365-2311.2008.01034.X

Cadotte MW, Yasui SLE, Livingstone S, MacIvor JS (2017) Are urban systems beneficial, detrimental, or indifferent for biological invasion? Biological Invasions 2017 1912 19:3489–3503. https://doi.org/10.1007/S10530-017-1586-Y

Centanni J, Kaufmann B, Blatrix R, Blight O, Dumet A, Jay-Robert P, Vergnes A (2022) High resolution mapping in Southern France reveals distributions of supercolonial and monodomous species in the *Tapinoma nigerrimum* complex (Hymenoptera: Formicidae) are related to sensitivity to urbanization. Myrmecological News.

Cerdá X, Retana J, Bosch J, Alsina A (1989) Exploitation of food resources by the ant Tapinoma nigerrimum (Hym., Formicidae). Acta Oecologica, 10(4), 419-429.

Cerdá X, Retana J, Manzaneda A (1998) The role of competition by dominants and temperature in the foraging of subordinate species in Mediterranean ant communities. Oecologia 117, 404–412. https://doi.org/10.1007/s004420050674

Chybicki IJ & Burczyk J (2009) Simultaneous Estimation of Null Alleles and Inbreeding Coefficients. Journal of Heredity 100, 106–113.

Chytry M, Danihelka J, Axmanová I, et al (2010) Floristic diversity of an eastern Mediterranean dwarf shrubland: the importance of soil pH. Journal of Vegetation Science 21:1125–1137. https://doi.org/10.1111/J.1654-1103.2010.01212.X

Clémencet J, Viginier B, Doums C (2005) Hierarchical analysis of population genetic structure in the monogynous ant Cataglyphis cursor using microsatellite and mitochondrial DNA markers. Molecular Ecology, 14(12), 3735–3744. https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2005.02706.X

Clergeau P (2007) Une écologie du paysage urbain. Edition Apogée.

Colyn M, Prunier JG, Legendre X, et al (2015) La génétique du paysage : origine et flux de dispersion des populations de cerf dans la Région Centre. Faune Sauvage 307:24–31

Cordonnier M, Gayet T, Escarguel G, Kaufmann B (2019a) From hybridization to introgression between two closely related sympatric ant species. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 57:778–788. https://doi.org/10.1111/JZS.12297

Cordonnier M, Gibert C, Bellec A, et al (2019b) Multi-scale impacts of urbanization on species distribution within the genus *Tetramorium*. Landscape Ecology 34:1937–1948. https://doi.org/10.1007/s10980-019-00842-7

Cordonnier M, Escarguel G, Dumet A, Kaufmann B (2020a) Multiple mating in the context of interspecific hybridization between two *Tetramorium* ant species. Heredity (Edinb) 124:675. https://doi.org/10.1038/S41437-020-0310-3

Cordonnier M, Bellec A, Escarguel G, Kaufmann B (2020b) Effects of urbanization-climate interactions on range expansion in the invasive European pavement ant. Basic and Applied Ecology 44:46–54. https://doi.org/10.1016/J.BAAE.2020.02.003 https://www.journals.elsevier.com/basic-and-applied-ecology

Davis ES, Murray TE, Fitzpatrick Ú, et al (2010) Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floralis*. Molecular Ecology 19:4922–4935. https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2010.04868.X

Espadaler X, Rey S, Bernal V (2004) Queen number in a supercolony of the invasive garden ant, *Lasius neglectus*. Insectes Sociaux 51:232–238. https://doi.org/10.1007/S00040-003-0732-Y

Espadaler X, Tartally A, Schultz R, et al (2007) Regional trends and preliminary results on the local expansion rate in the invasive garden ant, *Lasius neglectus* (Hymenoptera, Formicidae). Insectes Sociaux 54:293–301. https://doi.org/10.1007/S00040-007-0944-7

Estoup A & Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? Molecular Ecology 19:4113–4130. https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2010.04773.X

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology ;14(8):2611-20. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x. PMID: 15969739.

Eyer PA, McDowell B, Johnson LNL, Calcaterra LA, Fernandez MB, Shoemaker D, Puckett RT, Vargo EL (2018) Supercolonial structure of invasive populations of the tawny crazy ant Nylanderia fulva in the US. BMC Evolutionary Biology 29;18(1):209. doi: 10.1186/s12862-018-1336-5. PMID: 30594137; PMCID: PMC6310932.

Frantz AC, Cellina S, Krier A, et al (2009) Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? Journal of Applied Ecology 46:493–505. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01606.x

Gippet JMW, Mondy N, Diallo-Dudek J, et al (2017) I'm not like everybody else: urbanization factors shaping spatial distribution of native and invasive ants are species-specific. Urban Ecosystems 20:157–169. https://doi.org/10.1007/s11252-016-0576-7

Gippet JM, Liebhold AM, Fenn-Moltu G, Bertelsmeier C (2019) Human-mediated dispersal in insects. Current Opinion in Insect Science, 35:96–102

Giraud T, Pedersen JS, Keller L (2002) Evolution of supercolonies: the Argentine ants of southern Europe. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:6075–9. https://doi.org/10.1073/pnas.092694199

Goudet J (2005) hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. Molecular Ecology Notes, 5(1), 184–186. https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2004.00828.X

Goudet J, Jombart T, Kamvar ZN, Archer E, Hardy O (2013) Estimation and tests of hierarchical F-statistics. R package version 0.04-10. https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/hierfstat.pdf

Gruber B & Adamack AT (2015) landgenreport: A new R function to simplify landscape genetic analysis using resistance surface layers. Molecular Ecology Resources, 15(5), 1172–1178. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12381

Helms JA & Kaspari M (2015) Reproduction-dispersal tradeoffs in ant queens. Insectes Sociaux 62, 171–181.

Helms J (2018) The flight ecology of ants (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News 26, 19–30.

Heterick BE, Lythe M, Smithyman C (2013) Urbanisation factors impacting on ant (Hymenoptera: Formicidae) biodiversity in the Perth metropolitan area, Western Australia: Two case studies. Urban Ecosystems 16:145–173. https://doi.org/10.1007/s11252-012-0257-0

Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. Journal of Applied Ecology 46, 10–18.

INSEE (2017) https://www.insee.fr/fr/information/2016807

INSEE (2018) https://www.insee.fr/fr/information/2016807

NSEE (2022a) https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405599?geo=COM-34172

INSEE (2022b) https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405599?geo=COM-34301

INSEE (2022c) https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405599?geo=COM-30189

Jha S & Kremen C (2013) Urban land use limits regional bumble bee gene flow. Molecular Ecology, 22: 2483-2495. https://doi.org/10.1111/mec.12275

Jokimäki J, Suhonen J, Jokimäki-Kaisanlahti ML, Carbó-Ramírez P (2016) Effects of urbanization on breeding birds in European towns: Impacts of species traits. Urban Ecosystems 19:1565–1577. https://doi.org/10.1007/s11252-014-0423-7

Jombart T (2008) Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24:1403–1405. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129

Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics 11:94. https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94

Justine JL, Winsor L, Gey D, et al (2020) Obama chez moi! The invasion of metropolitan France by the land planarian Obama nungara (Platyhelminthes, Geoplanidae). PeerJ:e8385. https://doi.org/10.7717/PEERJ.8385/SUPP-6

Khimoun A, Doums C, Molet M, et al (2020) Urbanization without isolation: The absence of genetic structure among cities and forests in the tiny acorn ant *Temnothorax nylanderi*. Biology Letters 16:. https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0741

Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al (2015) Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Molecular Ecology Resources 15:1179–1191. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387

Lou RN, Jacobs A, Wilder AP, Therkildsen NO (2021) A beginner's guide to low-coverage whole genome sequencing for population genomics. Molecular Ecology 30:5966–5993. https://doi.org/10.1111/MEC.16077

McKinney ML & Lockwood JL (1999) Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. Trends in Ecology & Evolution, 14, pp. 450-453

McKinney ML (2006) Urbanization as a major cause of biotic homogenization. Biological Conservation, 127:247-260.

McKinney ML (2008) Effects of urbanization on species richness: A review of plants and animals. Urban Ecosystems, 11:161–176. https://doi.org/10.1007/s11252-007-0045-4

Menke SB, Booth W, Dunn RR, et al (2010) Is It Easy to Be Urban? Convergent Success in Urban Habitats among Lineages of a Widespread Native Ant. PloS One 5:e9194. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009194

Miles LS, Rivkin LR, Johnson MTJ, et al (2019) Gene flow and genetic drift in urban environments. Molecular Ecology 28:4138–4151. https://doi.org/10.1111/MEC.15221

Moffett MW (2012) Supercolonies of billions in an invasive ant: What is a society? Behavioral Ecology 23:925–933. https://doi.org/10.1093/BEHECO/ARS043

Molina MJ & Molina LT (2004) Megacities and atmospheric pollution. Journal of the Air & Waste Management Associationhttps://www.tandfonline.com/toc/uawm20/current Jun;54(6):644-80. Doi: 10.1080/10473289.2004.10470936. PMID: 15242147.

Munshi-South J, Zak Y, Pehek E (2013) Conservation genetics of extremely isolated urban populations of the northern dusky salamander (*Desmognathus fuscus*) in New York City. PeerJ. https://doi.org/10.7717/peerj.64

Onodera S, Saito M, Sawano M, Hosono T, Taniguchi M, Shimada J, Umezawa Y, Lubis RF, Buapeng S, Delinom R (2008) Effects of intensive urbanization on the intrusion of shallow groundwater into deep groundwater: examples from Bangkok and Jakarta. Science of The Total Environment 404: 401-410.

Passera L & Keller L (1994) Mate availability and male dispersal in the Argentine ant *Linepithema humile* (Mayr) (=*Iridomyrmex humilis*). Animal Behaviour *48*, 361–369.

Pinto J & Garcia-Lozano C (2013) Recent historical transformation and current situation of the dune landscape in Catalonia. In Restoration and Management of Dune Systems. Case Studies, pp. 81–100.

Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, et al (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. Journal of Heredity 95:536–539. https://doi.org/10.1093/jhered/esh074

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959

Prunier JG, Kaufmann B, Fenet S, Picard D, Pompanon F, Joly P, Léna JP (2013) Optimizing the trade-off between spatial and genetic sampling efforts in patchy populations: towards a better assessment of functional connectivity using an individual-based sampling scheme. Molecular Ecology 22, 5516–5530.

Prunier JG, Kaufmann B, Léna J-P, Fenet S, Pompanon F, Joly P (2014) A 40-year-old divided highway does not prevent gene flow in the alpine newt *Ichthyosaura alpestris*. Conservation Genetics 15, 453–468. https://www.springer.com/journal/10592

Puechmaille SJ (2016) The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. Molecular Ecology Resources 16:608–627. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512

QGIS Development Team (2019) QGIS, a free and open source geographic information system. Version 3.10.6. https://www.qgis.org/fr/site/

R Development Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.r-project.org/index.html

Ross KG & Trager JC (1990) Systematics and population genetics of fire ants (*Solenopsis saevissima* complex) from Argentina. Evolution (NY) 44:2113–2134. https://doi.org/10.1111/J.1558-5646.1990.TB04316.X

Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8: 103-106.

RStudio Team (2020) RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. http://www.rstudio.com/

Seifert B (2012) Clarifying naming and identification of the outdoor species of the ant genus *Tapinoma* FÖRSTER, 1850 (Hymenoptera: Formicidae) in Europe north of the Mediterranean region with description of a new species. Myrmecological News 16: 139-147.

Seifert B (2016) Clypeal excision in *Tapinoma* FÖRSTER, 1850 ants is adaptive (Hymenoptera: Formicidae). Contributions to Entomology 66: 1-5.

Seifert B (2017) The ecology of Central European non-arboreal ants-37 years of a broad-spectrum analysis under permanent taxonomic control. Soil Organisms 89:1–67

Seifert B, D'Eustacchio D, Kaufmann B, Centorame M, Lorite P, Modica MV (2017) Four species within the supercolonial ants of the *Tapinoma nigerrimum* complex revealed by integrative taxonomy (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News 24:123–144

Smouse PE & Peakall R (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. Heredity 82: 561-573.

Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2001) Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: Insights from Argentine ants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:1095–100. https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1095

Ugelvig LV, Drijfhout FP, Kronauer DJ, et al (2008) The introduction history of invasive garden ants in Europe: integrating genetic, chemical and behavioural approaches. BMC Biology 6:11. https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-11

Vásquez GM, Vargo EL, Silverman J (2012) Fusion between southeastern United States Argentine ant colonies and its effect on colony size and productivity. Annals of the Entomological Society of America 105:268–274. https://doi.org/10.1603/AN11114

Wang J (2011) coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. Molecular Ecology Resources, 11: 141-145. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02885.x

Ward DF, Harris RJ, Stanley MC (2005) Human-mediated range expansion of Argentine ants *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae) in New Zealand. Sociobiology 45:401–407

Yamamoto J, Uchida K, Takami Y (2013) Colonization and Persistence of Urban Ant Populations as Revealed by Joint Estimation of Kinship and Population Genetic Parameters. Journal of Heredity 104:639–648. https://doi.org/10.1093/JHERED/EST041

Zhivotovsky LA (2015) Relationships Between Wright's FST and FIS Statistics in a Context of Wahlund Effect. Journal of Heredity 106, 306–309.

Annexes

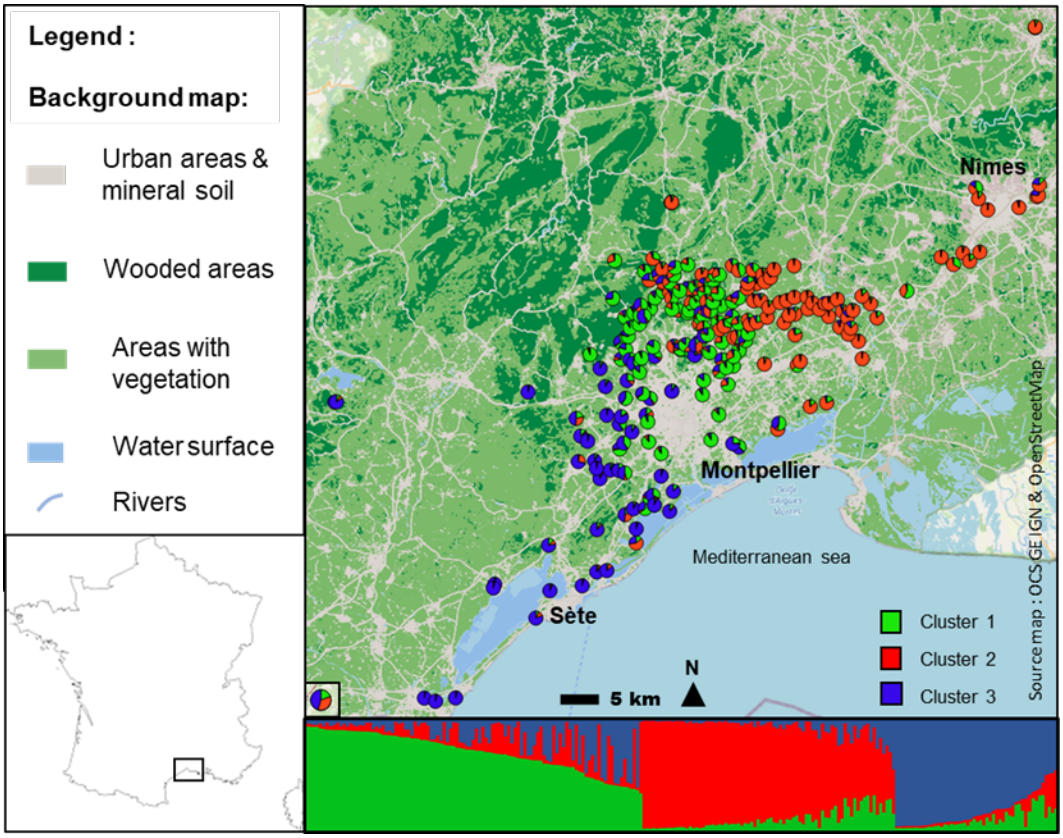


Figure S1. Distribution map and genetic clustering in *Tapinoma nigerrimum* (1 individual per site) using data obtained with STRUCTURE at K=3. Below map: K=3 STRUCTURE diagram of Q-values sorted by values. Background legends and position of map are indicated in right side panel.

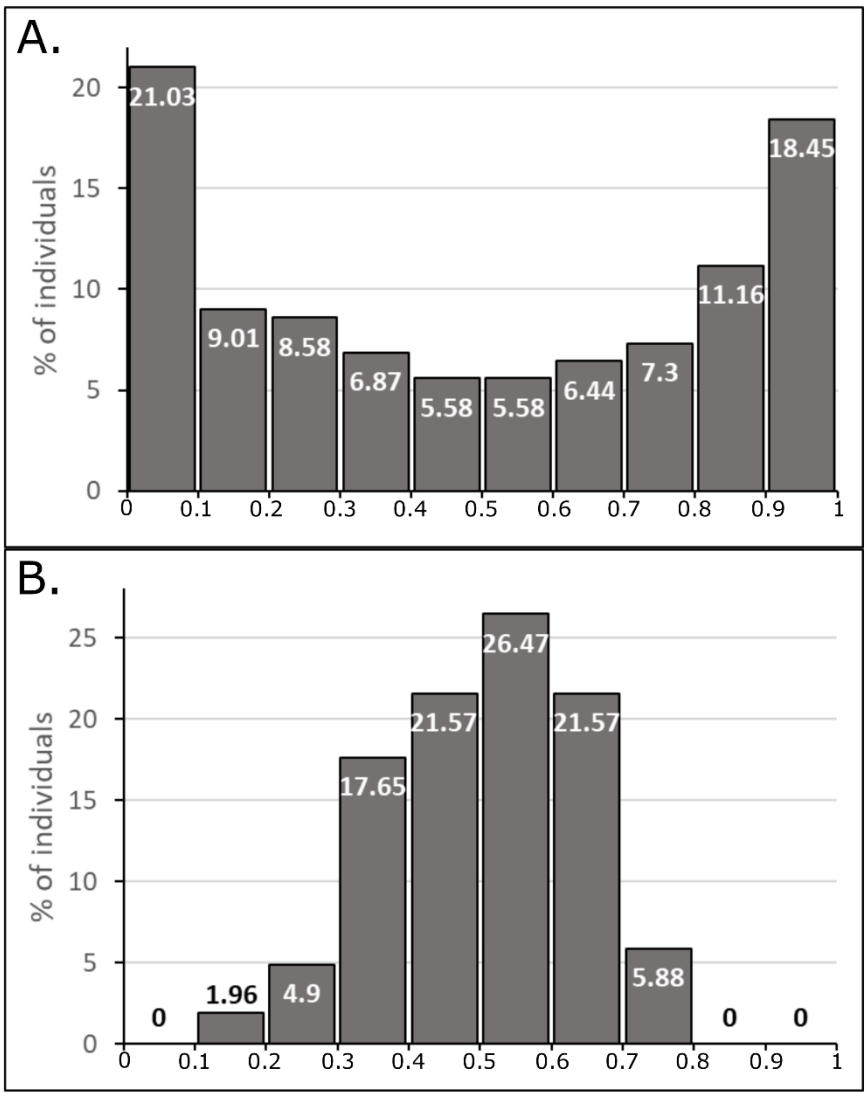


Figure S2. Distribution of Q-values (i.e. membership proportions into each cluster); x axis = Q-values intervals for Cluster 1, y axis = % of individuals belonging to Q-values intervals. A. *T. madeirense* (102 individuals), B. *T. nigerrimum* (233 individuals).

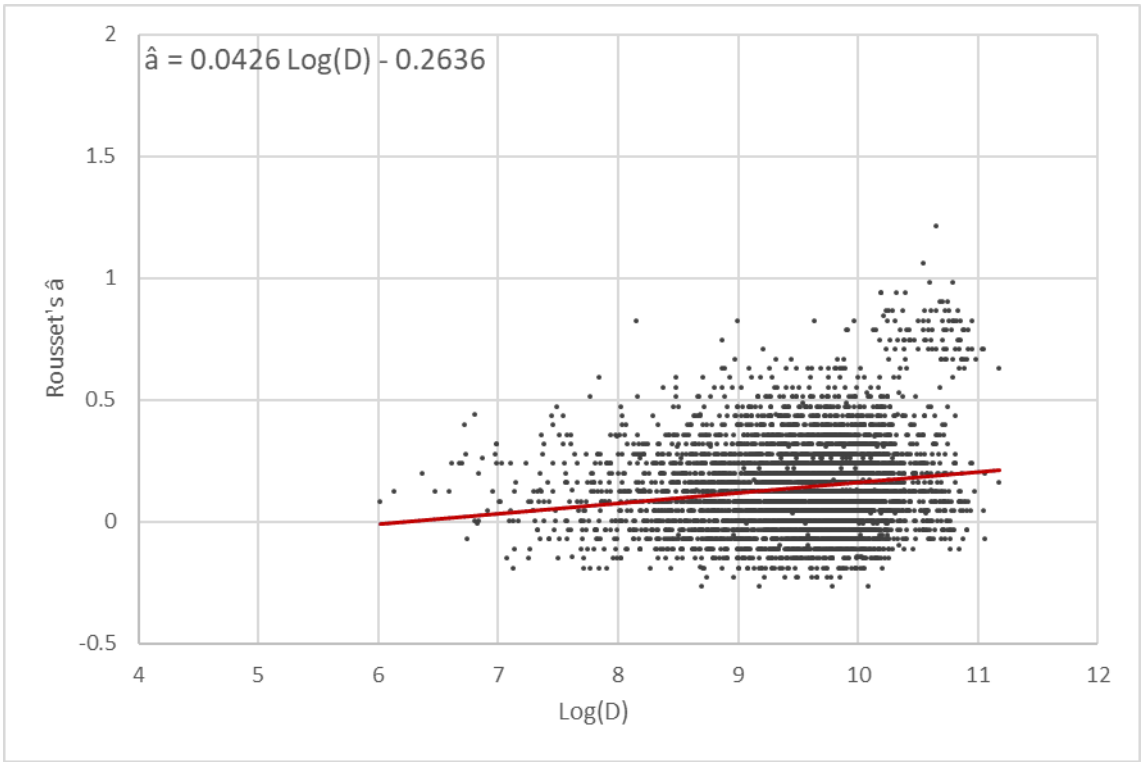


Figure S3. *Tapinoma madeirense*: regression of individual genetic distances (Rousset's â) on Log of metric distance. Regression line in red, equation of regression line upper corner. Mantel test p-value=1.

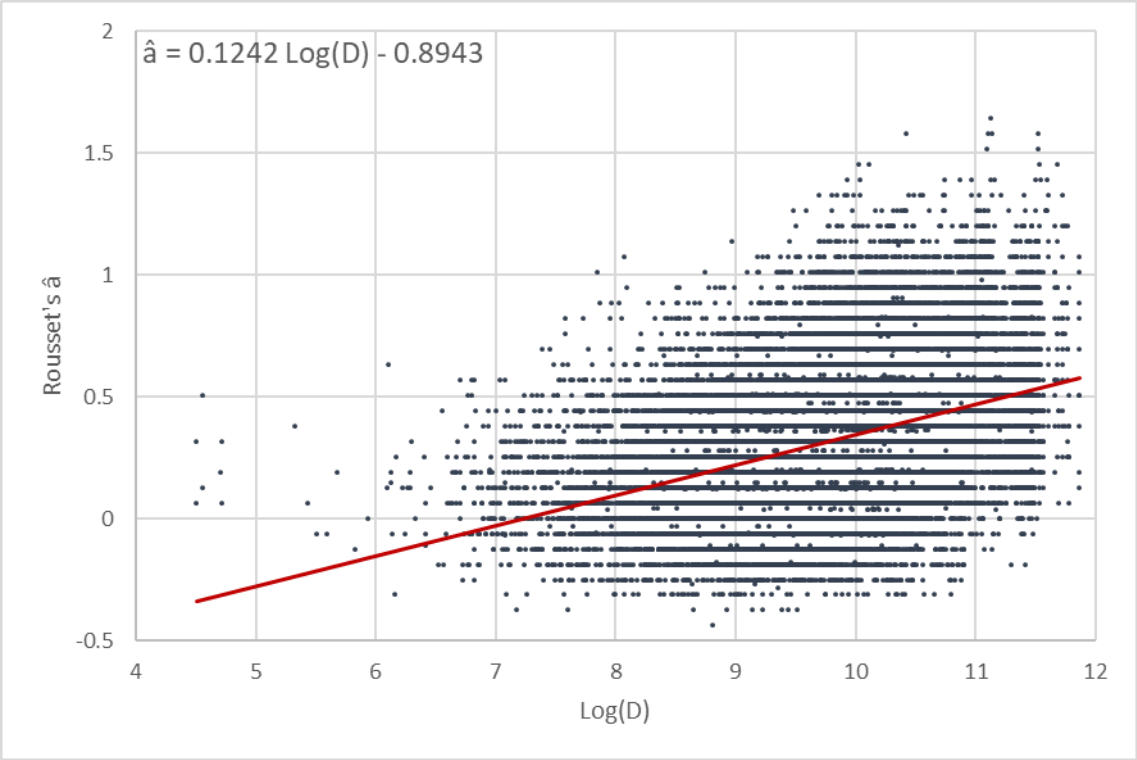


Figure S4. *Tapinoma nigerrimum*: regression of individual genetic distances (Rousset's â) on Log of metric distance. Regression line in red, equation of regression line upper corner. Mantel test p-value=1.

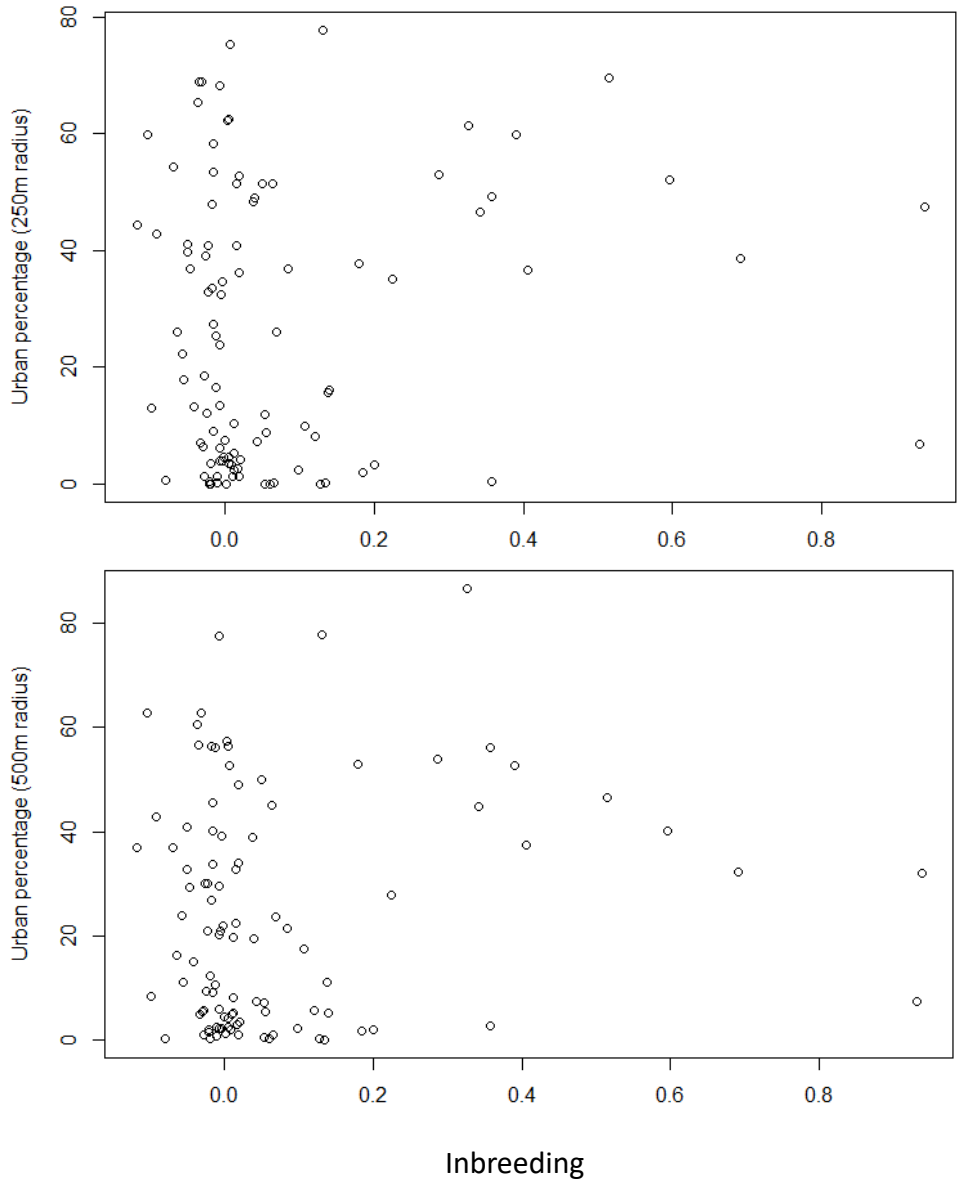


Figure S5. Correlogram between percentage of urbanization with 250 (upper panel) and 500m (lower panel) radius buffer zones and individual inbreeding for *Tapinoma madeirense*.

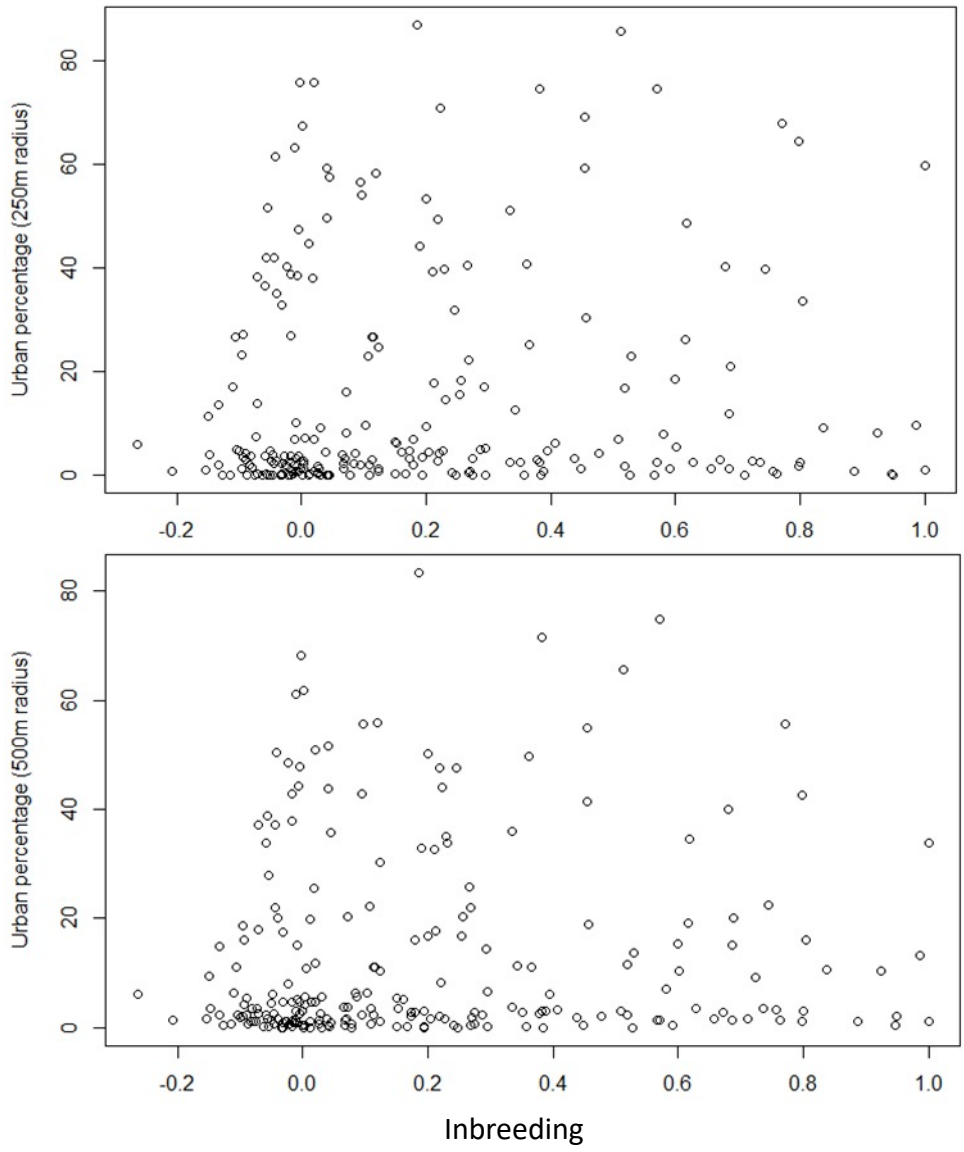


Figure S6. Correlogram between percentage of urbanization with 250 (upper panel) and 500m (lower panel) radius buffer zones and individual inbreeding for *Tapinoma nigerrimum*.

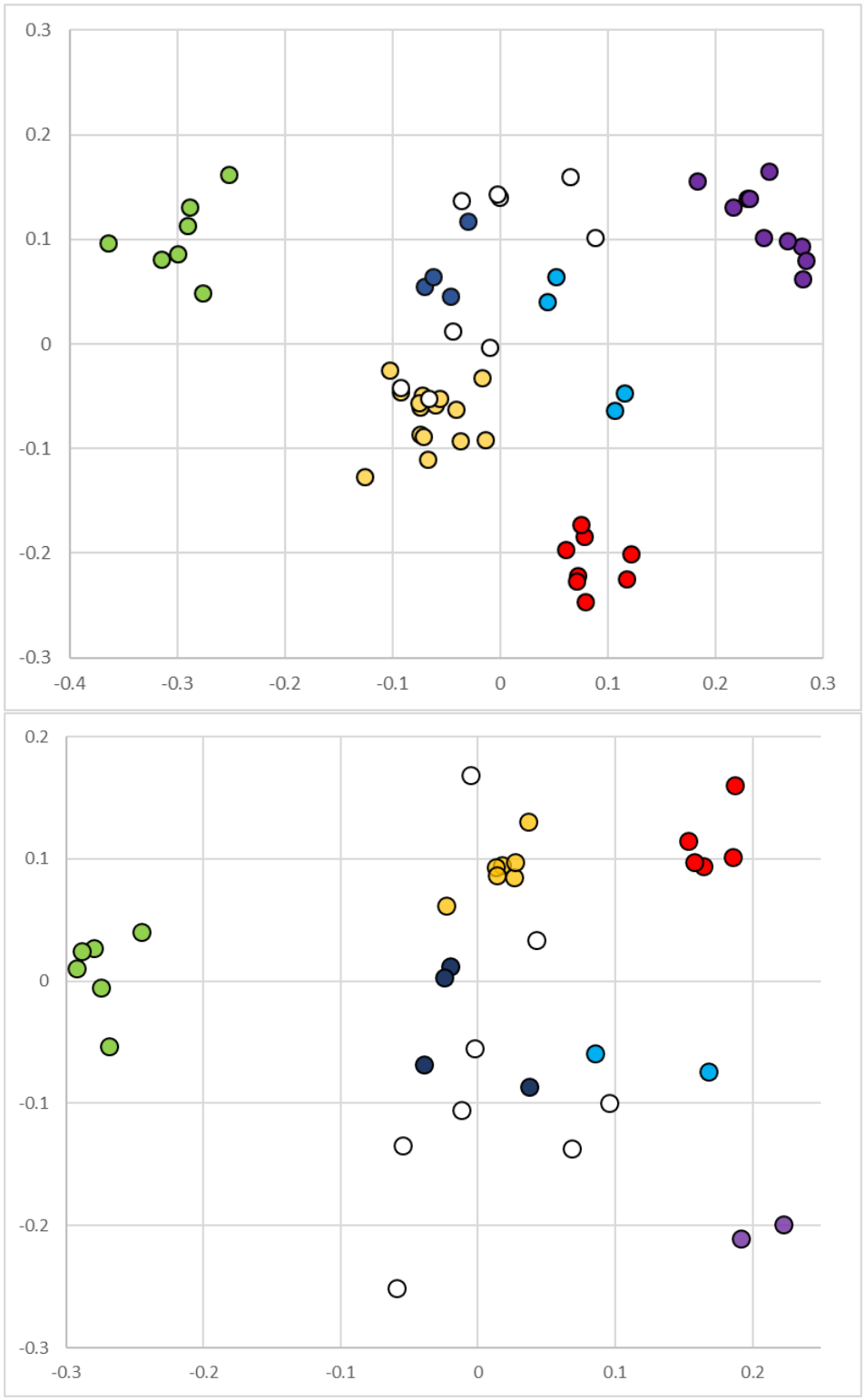


Figure S7. PCoA of genetic Chord-distances in *T. darioi*. Upper panel: PCoA of pairwise genetic distances between the 58 colonies where at least 4 individuals have been genotyped, axes 1-3. Lower panel: PCoA of pairwise genetic distances between the 35 colonies where at least 10 individuals have been genotyped, axes 1-3. **Colors** match the k=6 clusters obtained with Structure: cluster 1 = green, cluster 2 = red, cluster 3 = purple, cluster 4 = blue, cluster 5 = yellow, cluster 6 = dark blue. White dots = colonies with admixed individuals (max Q value at any cluster<0.8).

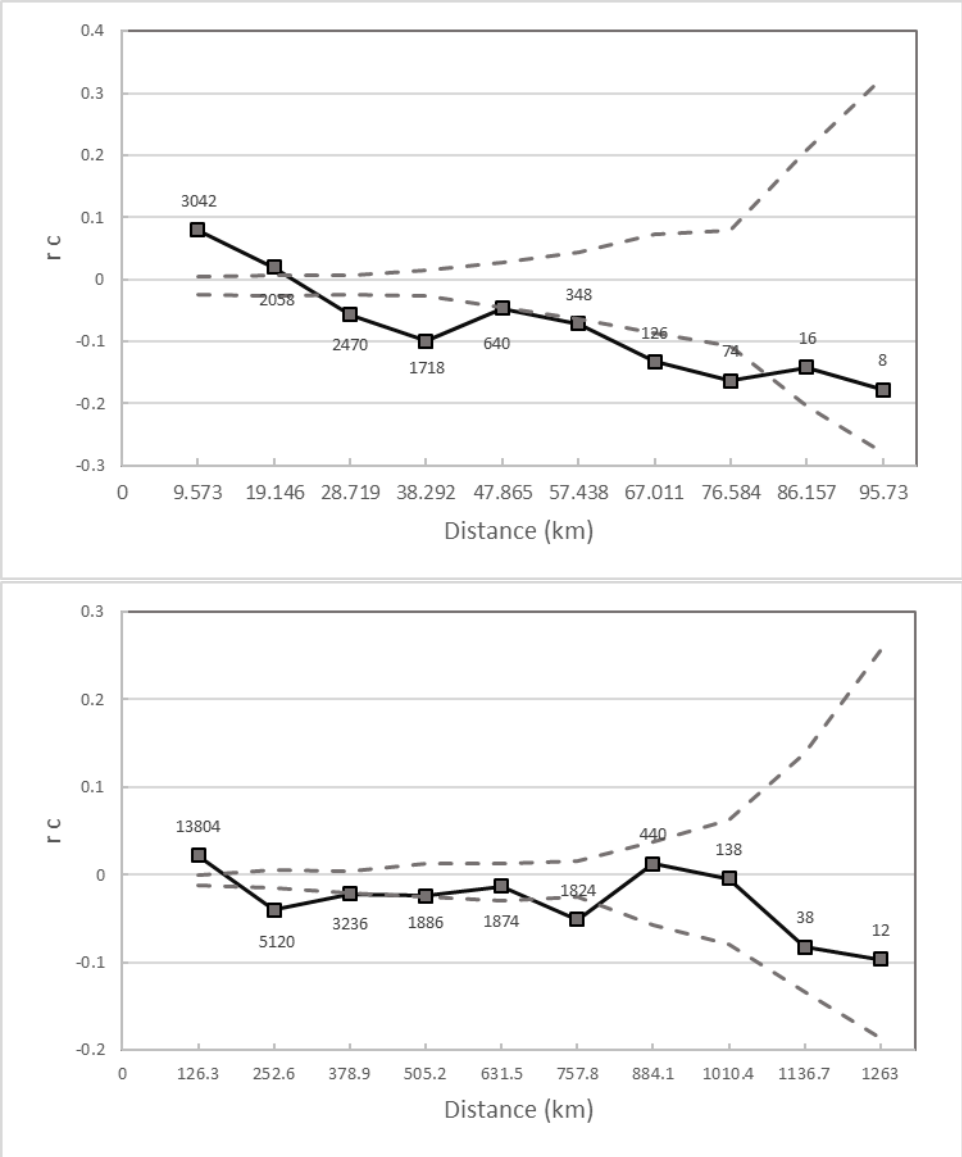


Figure S8. Spatial genetic autocorrelation in *T. darioi*. *x axis* = distance bins in km, *y axis* = the value of rc (autocorrelation coefficient)*, dashed lines* = lower and upper 95% confidence interval, *full line* = autocorrelation coefficient rc mean, *numbers above markers* = number of distance pairs in distance bins. Upper graph = landscape scale, lower graph = global scale.

Table S1. Population genetics basic statistics for *Tapinoma madeirense* (n = 102). Columns headings are Markers = Marker names, H_o = observed heterozygosity, H_s = expected heterozygosity, F_{is} = fixation index, asterisks indicate significance levels (HWE probability test, Genepop 4.7.5), Number of alleles = exact number of alleles over all individuals.

T. madeirense				
Marqueur	**Ho**	**Hs**	**Fis**	**Number of alleles**
F08	0.1275	0.1723	**0.2603****	3
H05	0.6667	0.7342	0.0920	12
B01	0.5882	0.6741	**0.1274****	5
H09	0.8333	0.8881	0.0616	19
D05	0.2745	0.3048	0.0994	2
F10	0.0000	0.0000	**NaN**	1
A11	0.2157	0.2840	**0.2405***	3
F12	0.3431	0.5089	**0.3258*****	5
B10	0.8627	0.9658	0.1067	61
C03	0.3922	0.4095	0.0424	12
A09	0.5588	0.6199	**0.0985*****	24
A10	0.2549	0.3186	**0.2000*****	7
B03	0.0098	0.0293	**0.6656****	3
A03	0.3824	0.4895	**0.2189***	3
E11	0.8922	0.9204	0.0307	21

Table S2. Population genetics basic statistics for *T. nigerrimum* (n = 233). Columns headings are Markers = Marker names, H_o = observed heterozygosity, H_s = expected heterozygosity, F_{is} = fixation index, asterisks indicate significance levels (HWE probability test, Genepop 4.7.5), Number of alleles = exact number of alleles over all individuals.

T. nigerrimum				
Markers	**Ho**	**Hs**	**Fis**	**Number of alleles**
F08	0.4678	0.6840	**0.3161*** **	11
H05	0.0472	0.0790	**0.4028** **	4
B01	0.3004	0.4465	**0.3271*** **	6
H09	0.4120	0.6068	**0.3210*** **	4
D05	0.4206	0.4462	0.0574	4
F10	0.0000	0.0086	NaN	2
A11	0.0043	0.0382	**0.8877** **	4
F12	0.7339	0.8416	**0.1280***	17
B10	0.0129	0.0383	**0.6639*** **	6
C03	0.0086	0.0171	0.4986	4
A09	0.0086	0.0171	**0.4973***	2
A10	0.4936	0.6424	**0.2317*** **	7
B03	0.4163	0.5719	**0.2720*** **	7
A03	0.0000	0.0086	**1.0000** **	2
E11	0.6309	0.8465	**0.2547*** **	21

Table S3. Population genetics basic statistics for *T. darioi* (n = 169). Columns headings are Markers = Marker names, H_o = observed heterozygosity, H_s = expected heterozygosity, F_{is} = fixation index, asterisks indicate significance levels (HWE probability test, Genepop 4.7.5), Number of alleles = exact number of alleles over all individuals.

T. darioi				
Markers	**Ho**	**Hs**	**Fis**	**Number of alleles**
F08	0.6290	0.8285	**0.2408*** **	19
H05	0.0777	0.1601	**0.5148*** **	4
B01	0.1838	0.3935	**0.5328*** **	5
H09	0.4141	0.8265	**0.4989*** **	12
D05	0.0672	0.2374	**0.7169*** **	3
F10	0.1848	0.3735	**0.5052*** **	5
A11	0.1550	0.2654	**0.4160*** **	3
F12	0.4058	0.8667	**0.5317*** **	19
B10	0.0000	0.0038	NaN	2
C03	0.3079	0.5591	**0.4492*** **	5
A09	0.2281	0.2942	**0.2248*** **	2
A10	0.1190	0.4709	**0.7473*** **	5
B03	0.2878	0.6030	**0.5228*** **	7
A03	0.0030	0.0080	**0.6268** **	3
E11	0.3133	0.6382	**0.5092*** **	8

Table S4. Individual inbreeding coefficients for *T. madeirense* with their confidence intervals (method implemented in Coancestry (Wang, 2011) under the name of Lynch and Ritland (1999)).

T. madeirense			
Pop	***F***	***F 0.025***	***F 0.975***
E6_6	0.0046	-0.0695	0.5231
F6_11	-0.0078	-0.1075	0.2007
F6_5_17	0.3901	0.0134	0.8323
M_a01	0.6906	0.0706	0.9573
M_a16	0.0033	-0.0199	0.0638
M_a19	0.0839	-0.0621	0.3311
M_a22	-0.07	-0.1229	-0.0424
M_a28	0.0366	-0.0325	0.875
M_a30	-0.0049	-0.0366	0.179
M_a35	0.0528	-0.0338	0.4872
M_a49	-0.0181	-0.0813	0.0834
M_b03	0.0422	-0.0977	0.4664
M_b10	-0.0174	-0.1089	0.1446
M_b11	0.0502	-0.0066	0.2781
M_b12	0.3567	0.0046	0.6852
M_b19	0.0152	-0.0571	0.5169
M_b20	-0.0473	-0.1633	0.0186
M_b21	-0.0167	-0.0738	0.0747
M_b29	0.1789	-0.0763	0.675
M_b35	-0.0379	-0.1003	0.1803
M_b38	-0.0106	-0.0428	0.047
M_b42	0.2236	-0.1571	0.7535
M_b50	-0.0083	-0.0523	0.2163
M_c12	-0.0508	-0.1293	-0.0219
M_c25	-0.0232	-0.1014	0.1824
M_c29	0.9324	0.4429	1
M_c30	-0.0123	-0.0803	0.0808
M_c32	-0.0212	-0.1455	-0.005
M_c37	0.2003	-0.114	0.6248
M_c44	-0.092	-0.2217	-0.0116
M_c45	0.4066	-0.091	0.8497
M_d03	-0.0642	-0.3606	0.0099
M_d05	-0.1191	-0.1972	-0.0531
M_d06	-0.0192	-0.0638	0.0136
M_d08	0.1204	-0.0829	0.6342
M_d11	0.0112	-0.0624	0.2293
M_d12	-0.0344	-0.2191	-0.0117
M_d13	-0.0081	-0.1591	0.3038
M_d15	0.5141	-0.0345	0.8652
M_d17	0.0066	-0.1103	0.2247
M_d18	0.1304	0.0014	1
M_d20	-0.035	-0.1294	-0.0128
M_d22	-0.1046	-0.2502	-0.0406
M_d23	0.0186	-0.0108	1
M_e06	0.0073	-0.1826	0.3527
M_e16	0.3569	0.0316	0.8973
M_f02	0.0174	-0.0364	0.1298
M_f12	-0.0274	-0.0734	-0.0123
M_f15	0.02	-0.0827	0.7061
M_f23	-0.0202	-0.0679	-0.0089
M_f26	0.069	-0.1109	0.4242
M_f37	-0.0106	-0.0705	0.0818

M_f41	-0.0994	-0.1728	-0.057
M_f43	-0.0156	-0.045	0.0542
M_g04	0.0171	-0.0457	0.2175
M_g33	-0.0128	-0.0372	-0.0048
M_g47	-0.0277	-0.1098	0.1394
M_g50	-0.0043	-0.0506	0.0516
M_h12	-0.0283	-0.138	0.0509
M_h14	0.0119	-0.0982	0.3018
M_h15	0.0045	-0.0408	0.1582
M_h17	0.0643	-0.1678	0.4303
M_h19	-0.016	-0.0582	0.0268
M_h27	0.0015	-0.0575	0.1646
M_h41	0.3255	0.0128	0.8033
M_h47	0.0394	-0.0406	0.5217
M_i26	0.0099	-0.217	0.5377
M_i40	0.0151	-0.0446	0.4565
M_i47	0.0183	-0.0205	0.2507
M_i48	-0.0222	-0.1661	0.0751
M_j04	0.1343	-0.031	0.7163
M_j18	-0.081	-0.262	-0.0369
N_a29	0.5965	-0.0261	0.8775
N_a32	-0.0077	-0.0636	0.0976
N_a37	0.1842	-0.1594	0.7976
N_b01	0.0981	-0.0181	0.5103
N_b05	0.2864	-0.1287	0.7871
N_b22	-0.0031	-0.0833	0.1185
N_b33	0.0631	-0.0184	0.5317
N_b37	0.9384	0.6675	1
N_b41	0.1069	-0.0908	0.5667
N_b43	0.1385	0.014	1
N_c16	-0.0253	-0.129	0.0042
N_c41	-0.0294	-0.1677	0.2964
N_c46	-0.0225	-0.1195	0.0111
N_d09	0.1383	-0.0876	0.7231
N_d14	-0.0159	-0.1002	0.1464
N_d16	0.0539	-0.151	0.5255
N_d24	0.3421	-0.009	0.732
N_d26	-0.0321	-0.1686	-0.0036
N_e02	0.0048	-0.0248	0.416
N_e04	-0.0508	-0.0805	-0.017
N_e05	-0.0416	-0.1039	0.0244
N_e18	-0.0065	-0.0226	0.0663
N_f42	0.1273	-0.0946	0.5881
N_g06	-0.0084	-0.0444	0.1294
N_g22	-0.0585	-0.181	0.0699
N_g24	0.0117	-0.1084	0.4421
N_i32	-0.0008	-0.1056	0.2322
N_i37	0.0605	-0.0885	0.4571
N_i50	-0.0554	-0.1826	0.0262
N_j15	0.0535	-0.0517	0.6838

Table S5. Individual inbreeding coefficients for *T. nigerrimum* with their confidence intervals. The method used is implemented in Coancestry under the name of Lynch and Ritland (1999).

T. nigerrimum			
Pop	***F***	***F 0.025***	***F 0.975***
N_f45	0.186	-0.0252	0.9351
N_a05	0.455	0.0548	1
N_b02	0.8863	-0.0388	1
N_a02	-0.0034	-0.3519	0.1949
N_j12	-0.0174	-0.3351	0.2585
N_i13	0.0973	-0.1452	0.7092
N_b48	0.0294	-0.0336	1
N_a20	-0.0505	-0.1953	0.3144
N_j25	0.2677	-0.1898	0.7619
N_i04	0.1734	-0.2586	0.824
N_b07	-0.0175	-0.2575	0.374
N_RB3103	0.7979	0.1842	1
N_b24	-0.0717	-0.2365	0.2324
N_b15	0.7702	0.0613	1
N_f28	0.1087	-0.2078	0.5616
N_c07	0.1095	-0.2616	0.7732
N_c17	0.3352	-0.0198	1
N_g11	-0.1331	-0.28	0.2999
N_h26	1	1	1
N_f33	-0.264	-0.5596	-0.0487
N_j09	-0.0593	-0.2723	0.6429
N_j17	0.6578	-0.0997	1
H_RB3093	0.9459	0.2037	1
N_c22	0.0258	-0.3901	0.562
N_i11	0.0441	-0.1557	1
N_g18	0.045	-0.3893	0.5728
N_h04	0.4536	-0.2072	1
N_h45	0.4571	-0.0832	0.9756
N_f40	0.0411	-0.0768	0.6008
N_a36	-0.0039	-0.1811	0.2531
N_i49	0.174	-0.1251	1
M_d07	0.2539	-0.4329	0.784
N_d04	-0.0418	-0.2669	0.2763
N_g05	0.2277	-0.1517	0.6752
N_a50	-0.0627	-0.2777	0.2354
N_b32	0.0016	-0.1484	0.3021
N_c15	0.6863	0.2665	1
N_g23	0.1495	-0.0539	1
N_b40	0.1029	-0.0036	1
N_b36	-0.0395	-0.1954	0.4979
N_i31	0.4064	-0.1381	1
N_i36	0.3573	-0.219	0.8484
N_e03	0.1803	0.0196	1
N_c39	0.4774	-0.3523	0.8434

N_e17	0.8046	0.2364	1
N_d21	0.6185	0.087	1
N_g21	-0.0595	-0.257	0.5376
N_j21	0.0137	-0.1341	0.612
N_h11	0.6285	-0.2027	0.9133
N_d29	0.2222	-0.0066	1
N_f36	-0.0392	-0.1585	0.1287
H_RB3092	0.3838	-0.0281	0.8894
H_RB3070	0.001	-0.0354	0.1919
N_a11	0.5693	0.2059	1
N_a10	0.1991	0.0182	1
RB06_L19	0.9245	0.4696	1
N_f39	0.0206	-0.2401	0.4319
N_a39	0.2695	0.0155	1
S_f47_01	0.0941	-0.0083	0.5939
N_a18	-0.0104	-0.3281	0.1117
N_a13	0.0056	-0.1671	0.2361
N_g35	0.4381	-0.0018	1
N_g36	0.2417	-0.1289	0.623
N_e08	0.2692	-0.0182	0.7146
GIGE01	-0.0546	-0.2072	0.033
N_e07	0.0719	-0.0113	0.944
N_g37	0.0125	-0.0134	0.1762
N_a17	-0.0079	-0.1819	0.3466
N_c47	0.0172	-0.2086	0.3646
N_f20	0.2052	-0.0534	1
N_c49	0.245	-0.158	0.858
N_g41	0.1061	-0.1241	0.6135
N_a14	-0.0705	-0.2235	0.1222
N_i46	0.0432	-0.1123	0.4727
N_a34	0.1532	-0.0769	1
N_a12	0.2201	-0.0116	1
N_j05	-0.0087	-0.2126	0.7585
N_f11	0.0272	-0.141	0.3483
RB03_F19	0.0708	-0.0226	0.717
RB01_B19	0.1242	-0.1808	0.6968
N_f05	-0.0489	-0.2012	-0.0125
N_f14	0.1611	-0.1143	1
N_g40	0.6009	-0.1507	0.9441
M_j26	-0.0172	-0.1747	0.2442
N_i45	0.5656	0.021	1
N_f19	-0.1329	-0.4588	-0.0526
N_i03	0.026	-0.0886	0.6004
N_f03	0.1245	-0.1978	0.7675
S_f13_01	0.5798	-0.1148	1
N_f17	-0.0314	-0.2286	0.6144
N_f21	-0.149	-0.3504	-0.0721
N_f04	0.266	-0.0213	1
N_g09	0.086	-0.1691	0.6992
N_f18	-0.0456	-0.2794	0.3705

N_a44	-0.0264	-0.2447	0.2518
N_d01	-0.0048	-0.2504	0.3992
N_d02	0.6891	0.0453	0.9059
N_g39	0.2281	-0.2393	0.6366
N_g08	-0.1468	-0.4864	-0.0643
N_a45	-0.0175	-0.2097	0.2383
N_g07	0.0646	-0.2231	0.8528
VLMT1	0.5073	0.0282	0.8694
VLMT2	-0.0103	-0.1021	0.2256
N_c31	0.3435	-0.013	1
N_a42	0.7104	-0.0882	1
S_f22_01	0.1138	-0.0564	0.7664
N_j01	-0.0277	-0.5467	-0.0111
N_g03	0.0001	-0.0628	0.1517
N_a41	0.7565	-0.1585	1
N_j02	-0.0571	-0.2033	0.3132
N_a46	0.039	-0.0083	1
N_f24	0.2953	-0.1208	0.8877
N_a47	-0.0942	-0.2935	-0.0402
RB05_J19	-0.0234	-0.2163	0.3046
RB04_H19	0.3615	-0.1032	0.8816
G6_1_01	0.513	-0.1695	1
N_f25	-0.1095	-0.3498	0.2246
N_h10	0.5695	0.0653	1
RB3009	0.592	-0.0761	1
RB2976	0.4477	-0.1867	0.8805
RB2977	-0.0013	-0.097	0.4142
RB2995	0.0042	-0.035	1
RB2951	0.0677	-0.0572	0.7418
N_c05	-0.0548	-0.2412	0.1744
N_a48	0.1203	-0.0428	1
SMATH	-0.0953	-0.3603	-0.0319
N_j03	0.0775	-0.1143	0.7815
PRAGP	0.115	-0.0296	0.8668
PRAK	0.1131	-0.2083	1
PRAPN	-0.1065	-0.28	0.1034
PRAK2	0.3654	-0.1914	0.819
N_c06	0.2746	-0.3624	0.7216
N_h07	-0.0795	-0.2584	0.0751
N_a40	-0.0843	-0.4214	0.2274
S_h08_01	0.0681	-0.414	0.6832
S_f29_01	-0.1536	-0.2714	0.1036
N_h32	0.1935	-0.1252	1
S_f27_01	0.0204	-0.2322	0.5053
S_c04_01	-0.0993	-0.398	-0.0471
S_h35_01	0.0774	-0.3098	0.7213
N_h25	0.2471	-0.1721	0.8365
N_c26	-0.0894	-0.2227	0.1367
N_h33	0.3785	-0.1378	0.9054
N_g43	0.1936	-0.2112	0.7263

N_g44	0.3509	-0.0388	1
N_h37	0.0949	-0.2242	0.5341
N_g38	-0.0733	-0.3796	0.1974
N_c10	-0.1033	-0.2708	-0.0054
S_f30_01	0.1786	-0.1294	0.8226
N_h36	-0.1152	-0.3383	-0.016
N_h34	-0.088	-0.2491	0.2456
N_h24	-0.0138	-0.1699	0.6393
N_c09	0.1934	-0.0258	1
N_g42	0.335	-0.0734	1
N_f32	0.1905	-0.0239	1
N_b23	0.2189	-0.2246	0.6935
N_h09	-0.0235	-0.1635	0.3998
N_i24	-0.0337	-0.2063	0.4575
N_i17	-0.0326	-0.1899	0.2373
N_h39	0.5271	-0.07	1
N_i23	-0.0168	-0.2676	0.3707
S_c43_01	-0.0573	-0.3489	0.3254
N_i20	0.012	-0.1301	0.4976
N_g10	-0.0905	-0.3475	0.6948
N_c48	-0.0309	-0.2343	0.1946
N_c50	-0.0106	-0.17	0.5096
N_d28	0.7976	0.3586	1
N_g25	0.2187	-0.0034	1
N_i22	-0.2078	-0.3202	0.0791
N_i18	0.0835	-0.2304	0.6265
N_b39	-0.081	-0.3602	0.1548
N_h31	-0.0511	-0.246	0.2363
N_h30	0.0699	-0.4181	0.7633
N_g26	0.2754	-0.2253	0.7711
N_i21	-0.0754	-0.2591	0.0377
N_i19	0.3953	0.0305	1
S_c27_01	-0.0321	-0.2821	0.0672
N_i35	-0.0161	-0.3486	0.0291
N_g49	0.7628	0.2552	1
N_g29	0.2942	-0.0956	1
N_i34	0.0113	-0.0355	1
N_g27	0.1498	-0.1987	1
N_i25	0.2939	0.013	1
N_g48	-0.0715	-0.3153	0.4989
N_c33	0.6725	0.2634	1
N_i30	-0.1268	-0.3728	0.121
N_i27	-0.0207	-0.1635	0.3131
N_c03	-0.0945	-0.2763	0.3308
N_c28	0.2864	-0.1053	1
N_i28	-0.0052	-0.2521	0.3722
N_i29	0.5183	0.0669	1
RB08_P19	0.0303	-0.1314	0.6582
N_d27	0.3891	-0.1865	0.9003
N_c36	0.7238	0.1747	1

N_c35	0.1665	-0.0384	1
N_c34	-0.0083	-0.056	0.1767
N_c38	0.6857	0.0848	1
N_i38	-0.0449	-0.2465	0.3378
N_i39	0.2305	-0.1285	1
N_e14	0.0408	-0.1918	0.6386
N_e11	0.8009	-0.2174	0.9599
N_e13	0.8361	-0.1508	1
N_e15	0.02	-0.0906	1
N_g14	0.5179	-0.0408	1
RB02_D19	-0.0453	-0.2731	0.1798
N_g15	0.9861	0.6559	1
N_g16	0.3816	0.0372	1
N_i43	0.1242	0.0095	1
N_f07	0.004	-0.1042	0.5802
N_f09	0.0279	-0.0592	0.6646
N_i41	0.2566	-0.1333	1
N_i42	-0.0071	-0.2125	0.2434
N_f08	0.5279	-0.1375	0.9157
N_d19	0.211	-0.0952	0.7419
N_g17	0.0038	-0.3312	0.6604
N_g31	0.9485	0.5149	1
N_g30	0.0407	-0.2527	0.7583
N_g32	1	1	1
N_h02	0.7352	0.2149	1
N_h44	0.2117	-0.0566	1
N_h03	-0.0965	-0.2847	0.2869
N_h42	0.1998	-0.0475	0.923
N_h40	0.3812	-0.076	0.905
N_h48	0.679	-0.047	1
UZESU_01	0.7438	-0.0485	0.9788
UZENO_01	0.6152	0.1412	1
N_h49	-0.0439	-0.2973	-0.0131
N_h50	0.5993	-0.1182	1
ARM02	-0.0124	-0.0524	0.032
ARM03	0.3181	0.0276	1
ARM04	0.0675	-0.0172	0.6203
ARM05	0.7967	-0.2184	0.9545
ARM01	0.1359	-0.118	0.7902

CHAPITRE 3

Conséquences de la présence des fourmis invasives *Tapinoma darioi* sur la myrmécofaune des espaces verts urbains de Montpellier

Résumé

Les invasions biologiques sont connues comme étant une des causes principales de la dégradation de la biodiversité et modifient ainsi le fonctionnement des écosystèmes. Parmi les espèces invasives, on peut citer les fourmis qui peuvent impacter les autres espèces et notamment la myrmécofaune elle-même. Nous nous intéressons donc ici aux *Tapinoma darioi*, qui font partie du complexe *Tapinoma nigerrimum*, composé de quatre espèces. La présente étude porte sur l'effet de cette espèce sur la myrmécofaune, en ciblant les espaces verts urbains de Montpellier.

Nous avons échantillonné la myrmécofaune à l'aide de pièges Barber dans dix parcelles sélectionnées au sein d'espaces verts urbains Montpelliérains.

Nos analyses ont montré que *Messor barbarus* et *Tapinoma darioi* présentaient une co-occurrence positive s'expliquant probablement par des niches alimentaires différentes permettant leur coexistence. *Tapinoma darioi* n'a pas montré d'effet sur l'abondance ou la richesse spécifique du reste de la myrmécofaune dans ces espaces. Enfin, nous avons observé que les espèces de fourmis présentes sur les mêmes parcelles que *T. darioi* semblaient avoir la même niche étant donné leurs traits similaires.

Abstract

Biological invasions are known to be one of the main causes of biodiversity degradation and thus modify the functioning of ecosystems. Among the invasive species, we can mention ants that can impact other species and in particular the myrmecofauna itself. We are therefore interested here in *Tapinoma darioi*, which is part of the *Tapinoma nigerrimum* complex, composed of four species. The present study focuses on the effect of this species on the myrmecofauna, targeting the urban green spaces of Montpellier.

We sampled the myrmecofauna using Barber traps in ten selected plots within Montpellier's urban green spaces.

Our analyses showed that *Messor barbarus* and *Tapinoma darioi* showed a positive co-occurrence, probably due to a different food niche allowing their co-existence. *Tapinoma darioi* did not show any effect on the abundance or species richness of the rest of the myrmecofauna in these areas. Finally, we observed that the ant species present on the same parcels as *T. darioi* seemed to have the same niche given their similar traits.

1. Introduction

Depuis le 16ème siècle, le développement des activités humaines a entraîné l'augmentation des invasions biologiques qui s'est amplifiée ces 200 dernières années en raison de la massification et de globalisation des échanges commerciaux et de la navigation au long cours (di Castri, 1989 ; Mack et al., 2000 ; Vitousek et al., 1997).

La présence de fourmis invasives peut réduire les effectifs des autres fourmis, changer l'organisation des communautés voire entrainer la disparition locale de certaines espèces. De plus, une fois établies, en raison principalement de leur nombre, de leur taille et de leur mode de vie souterrain, il est difficile de contrôler leurs populations (Holway et al., 2002 ; Silverman & Brightwell, 2008). On peut citer le cas de la fourmi de feu (*Solenopsis invicta*), originaire du Brésil, qui a colonisé de nombreuses zones en Amérique du Nord et en Asie (King et al., 2009). Elle est dotée d'un puissant venin qui lui permet de tuer de nombreux invertébrés et vertébrés, comme des lézards ou des oiseaux nichant au sol (Vinson, 1994). Un autre cas connu est celui de la fourmi d'Argentine (*Linepithema humile*), espèce invasive originaire d'Amérique du Sud, introduite par les échanges commerciaux de denrées de toutes sortes, comme le café, et qui constitue aujourd'hui une supercolonie qui s'étend sur 6000 km le long du littoral méditerranéen (Blatrix et al., 2013 ; Chopard, 1921 ; Wetterer et al., 2006). Elle entraîne une baisse significative de la biodiversité par sa prolifération et envahit les habitations et les zones agricoles (Roura-Pascual et al., 2010 ; Ward, 2009).

Dans cette étude nous nous intéresserons à *Tapinoma darioi,* une fourmi invasive qui appartient au complexe *Tapinoma nigerrimum* (voir Chapitre 1, Centanni et al., 2022, Figure 32).



Figure 32 : Fourmis ouvrières *Tapinoma darioi* logées dans les interstices d'un revêtement urbain à proximité d'un espace vert de Montpellier. Photos : Julia Centanni.

Toutes les espèces du complexe préfèrent des habitats ouverts mais situés dans des contextes paysagers différents (Chapitre 1, Centanni et al., 2022 ; Blatrix et al., 2013 ; Cerdá et al., 1989). *Tapinoma magnum* et *T. darioi* sont plus abondantes dans les zones urbanisées du sud de l'Europe, mais aussi en Belgique, en Allemagne ou encore aux Pays Bas et forment des supercolonies (Dekoninck et al., 2015 ; Seifert et al., 2017). Au contraire, *Tapinoma nigerrimum*, une des espèces du complexe, préfère les habitats ouverts plus naturels de la région méditerranéenne, comme les alentours du Pic Saint Loup et de l'Hortus dans les garrigues au Nord de Montpellier (Chapitre 1, Centanni et al., 2022). *Tapinoma ibericum* est quant à elle, observée majoritairement en Espagne (Seifert et al., 2017). Notre étude porte ici exclusivement sur *Tapinoma darioi,* qui parmi les espèces invasives du complexe, est la plus présente sur le territoire de Montpellier (Chapitre 1, Centanni et al., 2022). Grâce à la cartographie réalisée dans le chapitre 1, nous avons ainsi pu localiser les zones de ces occurrences (Chapitre 1, Centanni et al., 2022). Dans le chapitre 2, nous avons montré que les échanges à travers les activités humaines (transports de plantes, de terre etc, …) semblaient jouer un rôle dans la dispersion de *T. darioi*. En effet, dans la zone méditerranéenne de nombreux végétaux sont implantés notamment dans les espaces verts. Dans son programme de développement durable, la ville de Montpellier s'oriente vers une végétalisation de plus en plus importante dans ses quartiers (INSEE & SOeS, 2009). Ainsi, une étude sur les conséquences de la présence de *T. darioi* sur la myrmécofaune dans les espaces verts urbains Montpellierains serait intéressante à mener.

Il n'existe jusqu'ici pas encore d'étude analysant les effets de *Tapinoma darioi* sur le reste de la myrmécofaune. Dans la littérature, se sont principalement les effets de la présence de *T. magnum* qui sont étudiés. En effet, en Italie, *T. magnum* a réduit les populations de parasites et de prédateurs des cochenilles du citronnier et de la vigne en protégeant ces dernières, afin de se nourrir de leur miellat (Mansour et al., 2012 ; Seifert et al., 2017). Elle a également directement causé des dommages considérables sur des plantations de raifort en blessant les plantes pour récupérer leur phloème (Seifert et al., 2017). Par ailleurs, une étude publiée en 2022, à St-Sulpice en Suisse, réalisée par Gippet et al. a montré que les sites envahis par *T. magnum* présentaient une richesse et une abondance de la myrmécofaune indigène significativement plus faibles. Ces auteurs ont utilisé une méthode par appât qui consiste en la pose de tubes Eppendorf de 2 mL remplis de coton et de nourriture le long de transects espacés de 4 mètres et qui permet de quantifier les relations de dominance entre les espèces.

Le département de l'Hérault, dans le sud de la France, où se situe notre étude, compte plus de 80 espèces de fourmis, ce qui représente environ 40 % de la myrmécofaune de France métropolitaine (Blatrix et al., 2013) dont certaines espèces sont endémiques de la méditerranée. Il semble donc important d'étudier les impacts de *T. darioi* sur le reste de cette riche myrmécofaune.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer les effets de la présence de *Tapinoma darioi* sur la myrmécofaune. Elle a été réalisée dans des parcelles de pelouse avec peu d'arbres (sachant qu'elle est observée dans les milieux ouverts) au sein des espaces verts urbains de la ville de Montpellier.

Il existe plusieurs manières de mesurer l'impact des fourmis sur la myrmécofaune. Des études sur le comportement, l'activité ou la dominance peuvent être réalisées. A titre d'exemple Blight et al. (2014) ont analysé le rôle des fourmis dominantes dans l'organisation des communautés méditerranéennes en étudiant le rôle de la compétition dans les communautés envahies et non par la fourmi d'Argentine. Par ailleurs, Gippet et al. en 2022 ont pu comparer l'activité de recherche de nourriture des espèces de fourmis indigènes entre les zones envahies et non envahies par *T. magnum*.

Dans cette étude, nous proposons d'analyser les impacts en trois étapes :

- Dans un premier temps nous avons effectué une analyse de co-occurrence permettant de quantifier la nature des associations entre les différentes espèces de fourmis (positive, négative ou aléatoire). Cette analyse permet également de tester si la composition de nos communautés est essentiellement due au hasard (majorité d'associations aléatoires entre les espèces) ou si elles sont structurées par d'autres mécanismes sans qu'ils soient testés à cette étape. La co-occurrence négative entre *Tapinoma darioi* et les autres espèces pouvant relever d'un impact négatif sur celles-ci via la compétition sans que puissent être exclus les effets de réponses variables à des différences de conditions environnementales entre les sites avec et sans *T. darioi*.

- Dans un second temps, nous avons testé formellement la réponse des communautés de fourmis à la présence de *Tapinoma darioi*. Afin de montrer l'effet pur de la présence de *T. darioi*, nous avons supprimé l'effet de co-variables environnementales. Nous avons analysé la réponse d'indicateurs comme la richesse spécifique et l'abondance via des analyses univariées mais également la structure des communautés via des analyses multivariées. Nos hypothèses seraient une diminution de la richesse spécifique et de l'abondance, lorsque *T. darioi* est présente, comme cela a pu être observé par exemple en Chine où la fourmi de feu *Solenopsis invicta* s'est développée (Wang et al., 2019).

- Dans un troisième et dernier temps, nous avons comparé les traits, c'est à dire les caractéristiques morphologiques, physiologiques, phénologiques et comportementales (McGill et al., 2006 ; Pey et al., 2014 ; Violle et al., 2007), des différentes espèces afin d'évaluer la possibilité que les espèces qui coexistent avec *T. darioi* aient des caractéristiques proches susceptibles d'entrainer un impact par compétition.

2. Matériels et méthodes

2.1. Zones d'études

La ville de Montpellier s'étend sur plus de 56,9 km² et dispose de 741 ha d'espaces verts publics répartis sur un ensemble de parcs urbains (Caula et al., 2009 ; INSEE, 2018 ; Mairie de Montpellier, 2021 ; Stanners & Bordeaux, 1995). Les espaces verts étudiés correspondent à des parcelles de terrain végétalisées constituées de parcs, de jardins, d'espaces naturels ou semi-naturels, de couloirs verts et d'autres espaces verts fonctionnels (Scottish Greenspace, 2008).

Dans chaque espace vert, le choix des parcelles échantillonnées a été réalisé en prenant en compte la préférence d'habitat de *Tapinoma darioi* pour les milieux ouverts. Les dix parcelles sélectionnées sont présentées dans le Tableau 3 et localisées sur la Figure 33. Deux types de parcelles ont été définies : avec et sans *Tapinoma darioi* (Tableau 3, Figure 33 et 34). La présence ou l'absence de *Tapinoma darioi* a été déterminée par échantillonnage systématique et analyses génétiques grâce à la cartographie réalisée préalablement à la présente étude (Chapitre 1, Centanni et al., 2022).

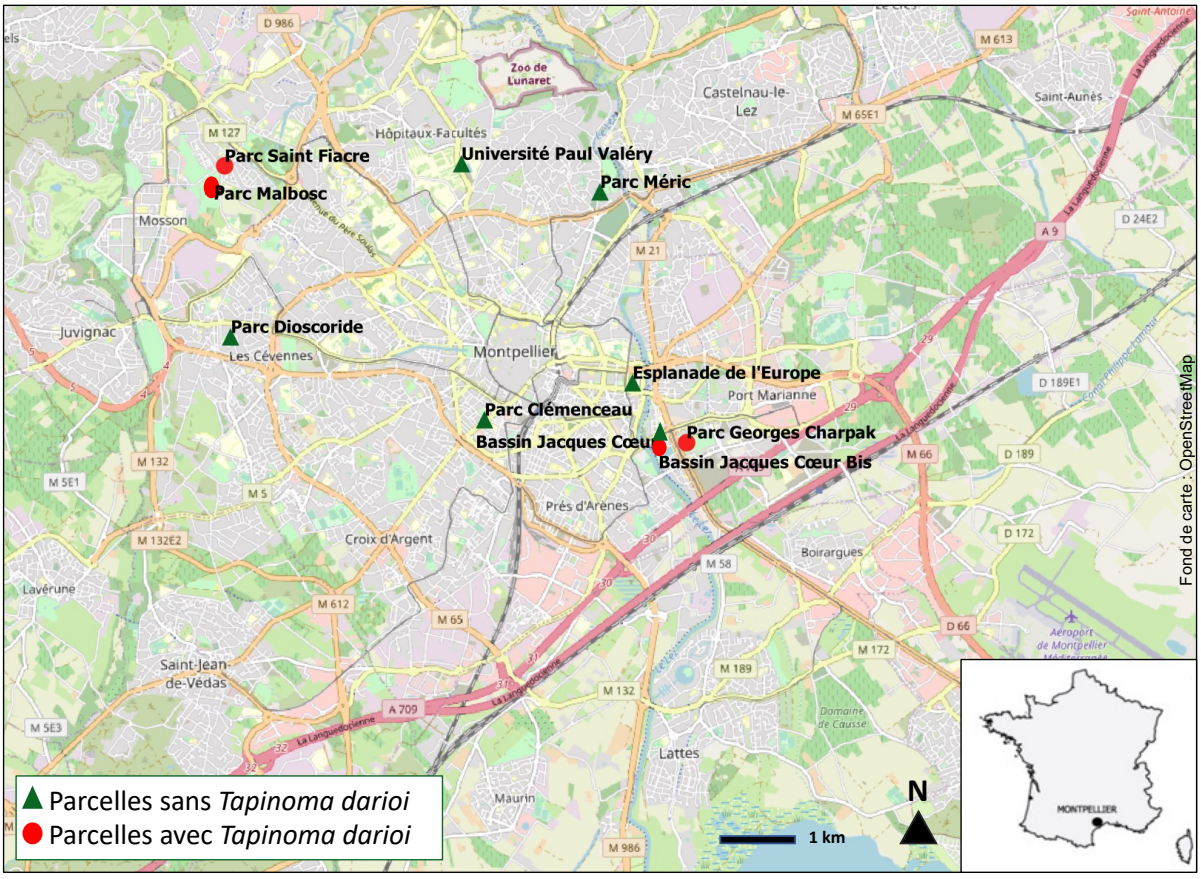


Figure 33 : Cartographie des dix parcelles échantillonnées dans Montpellier, les triangles verts représentent les parcelles sans *Tapinoma darioi* et les ronds rouges représentent les parcelles avec *T. darioi*.



Figure 34 : Photos de deux espaces verts urbains échantillonnés à Montpellier. A) L'Esplanade de l'Europe. B) Le parc Georges Charpak. Photos : Julia Centanni.

Les variables environnementales

Nous avons sélectionné quatre variables caractérisant directement ou indirectement l'environnement des espaces verts :

- La superficie des espaces verts qui a été obtenue à partir des données du site officiel de la Mairie de Montpellier (Mairie de Montpellier, 2021).
- L'usage de la parcelle avant qu'elle ne devienne un espace vert urbain. Cette information a été obtenue à partir du jeu de données d'occupation des sols de la Métropole de Montpellier.
- La période de conversion de la parcelle en espace vert urbain. Cette information a été obtenue soit à partir du site internet de la Mairie de Montpellier (Mairie de Montpellier, 2021) soit à partir du jeu de données de la Métropole.
- Le pourcentage urbain actuel dans une zone tampon circulaire de 300 m de diamètre. Pour cela nous nous sommes basés sur les données paysagères 2015 de l'OCS GE (Occupation du sol à Grande Echelle) et avons considéré comme représentatives du milieu urbain deux classes de couverture des sols : imperméable bâti (CS 1.1.1.1) et imperméable non bâti (CS 1.1.1.2). Les surfaces d'eau (CS 1.2.2) ont été soustraites.

Ces trois dernières variables ont été traitées avec le logiciel QGIS (QGIS Development Team, 2019).

Tableau 3 : Liste des dix parcelles échantillonnées et leurs caractéristiques c'est-à-dire : leurs superficies (sources : mesures Géoportail https://www.geoportail.gouv.fr/carte ou site de la Mairie de Montpellier, 2021), l'usage ancien, la période de conversion et le pourcentage urbain actuel dans une zone tampon de 300 m de diamètre.

Noms des parcelles et acronymes	Superficies	Usage ancien	Date creation Espace vert	Pourcentage Urbain (zone tampon 300m diametre)	*Tapinoma darioi* Présence	*Tapinoma darioi* Absence
Bassin Jacques Cœur (BJC)	35000 m²	Agricole	2010-2015	47,19		X
Bassin Jacques Cœur Bis (BJCB)	35000 m²	Agricole	2010-2015	43,56	X	
Charpak (CPK)	80000 m²	Agricole	2002-2008	15,77	X	
Clémenceau (CLM)	11000 m²	Naturel	2002-2008	77,5		X
Dioscoride (DCD)	6500 m²	Artificialisé	2002-2008	64,74		X
Esplanade de l'Europe (ELE)	14070 m²	Naturel	ant-1994	56,82		X
Malbosc (MLB)	300000 m²	Agricole	2002-2008	11	X	
Meric (MRC)	100000 m²	Naturel	ant-1994	12,75		X
Saint Fiacre (STF)	1800 m²	Artificialisé	2010-2015	49,69	X	
Université Paul Valéry (UPV)	2530 m²	Artificialisé	2010-2015	51,07		X
Total					4	6

2.2. Plan d'échantillonnage

La myrmécofaune a été échantillonnée à l'aide de pièges Barber au cours du mois d'avril 2019 (période favorable à l'activité des fourmis). Les pièges Barber permettent de piéger la faune mobile. Ce sont des récipients de 3 cm de diamètre et de 7 cm de profondeur qui sont enterrés, le bord supérieur affleurant à la surface du sol (Figure 35). Ces pièges contiennent un tiers d'eau sursaturée en sel (afin de conserver au mieux les individus) et quelques gouttes de savon liquide (afin de réduire la tension à la surface de l'eau et d'entrainer les insectes au fond du récipient) (Figure 35). Le liquide utilisé est considéré comme neutre (car inodore et incolore). La faune épigée se déplaçant sur la trajectoire des pièges sera donc capturée accidentellement (Vergnes, 2012). Cette expérimentation permet ainsi d'obtenir une estimation représentative de la richesse spécifique d'un milieu (données quantitatives et qualitatives) et présente l'avantage d'être reproductible dans différents milieux, d'être peu onéreuse et de nécessiter peu de maintenance (Greenslade, 1973 ; Ward et al., 2001).

Dans chaque parcelle, 10 pièges ont été posés, espacés de 5 mètres, le long de 2 transects (Ward et al., 2001) et de manière à ce qu'ils soient situés d'une part à 5 mètres des bordures et au moins à un mètre d'une fourmilière et des arbres (afin d'éviter tous biais) (Figure 36). Nous avons donc placé un total de 100 pièges facilement dissimulables. Ils ont été retirés après 48h afin de limiter tous risques de dégradations par la météo (orages et pluies) et par les promeneurs éventuels. En laboratoire, le contenu des pièges a ensuite été trié et seules les fourmis capturées ont été identifiées sous loupe binoculaire à l'aide de la clé d'identification des fourmis en France « AntArea » (http://clesimplefourmis.free.fr/index.html). Les fourmis n'ont pas été identifiées jusqu'à l'espèce pour le genre *Tetramorium*, car il est en cours de révision et ne dispose pas de clé de détermination précise.

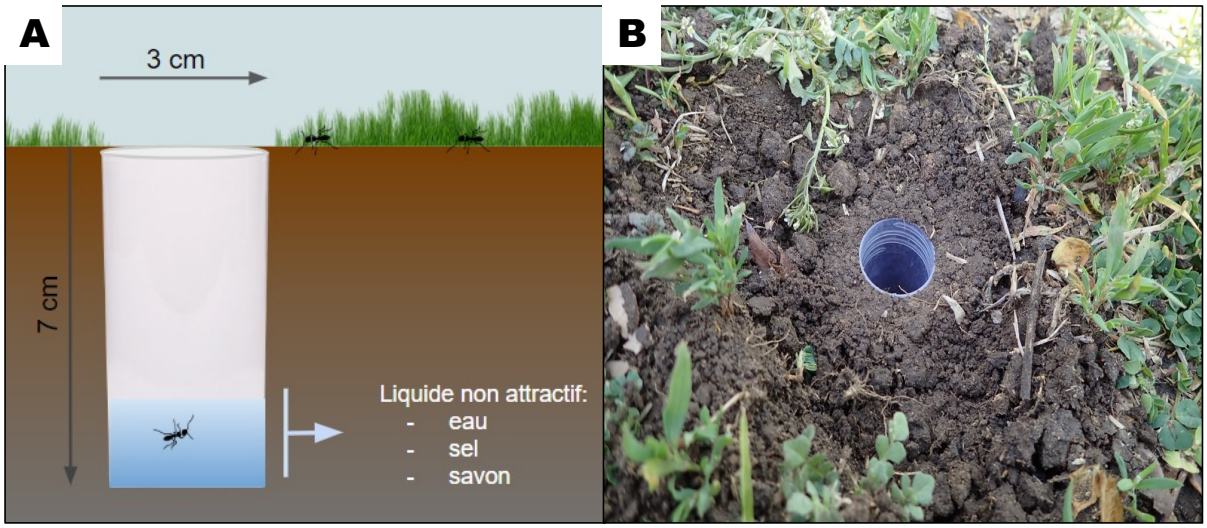


Figure 35 : A) Schéma d'un piège barber non attractif et B) Photo de piège Barber enterré dans une des parcelles.

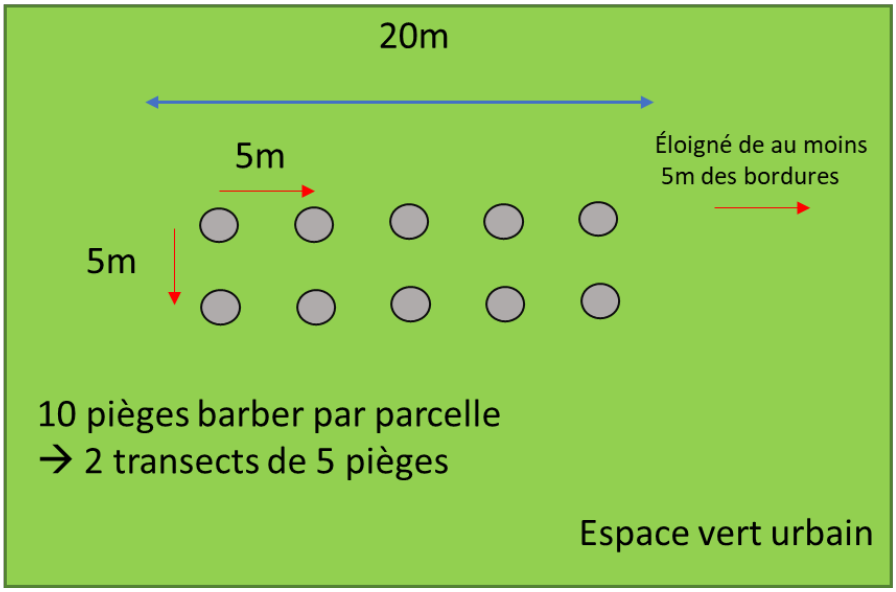


Figure 36 : Schéma de de la disposition des pièges au sein des parcelles dans les espaces verts urbains ; les cercles gris représentant les pièges Barber, 10 pièges sont posés par parcelle.

2.3. Analyses statistiques

Nous proposons d'analyser l'impact de *Tapinoma darioi* en suivant une démarche en trois étapes. Les analyses ont été réalisées avec R 3.4.0 (R Core Team, 2017) et RStudio (RStudio Team, 2015).

2.3.1. Estimation des abondances et préparation du jeu de données

Pour les fourmis et contrairement à la majorité des insectes, les pièges Barber ne permettent pas d'évaluer strictement l'abondance des espèces car les mœurs hautement sociales des fourmis provoquent une gamme de captures variant de 0 à plusieurs milliers d'individus si le piège est disposé proche du nid ou d'une colonie (Gotelli et al., 2011). Une telle gamme de variation rend donc une estimation de l'abondance par le nombre brut de

fourmis collectées par piège difficilement utilisable en statistique. Comme proposé par Gotelli et al. (2011), les abondances des fourmis correspondent à leurs occurrences : l'abondance d'une espèce donnée dans une parcelle est égale au nombre de pots de la parcelle dans laquelle l'espèce a été collectée et varie donc de 0 à 10.

L'espèce *Solenopsis fugax* (LATREILLE, 1798) a été trouvée dans les pièges mais retirée des analyses car elle est strictement endogée (Blatrix et al., 2013). On peut supposer que sa présence a été occasionnée par le retournement du sol lors de la mise en place des pièges.

2.3.2. Comparaison des espaces verts urbains étudiés

Afin de caractériser la liaison entre la présence de *Tapinoma darioi* et les variables environnementales (l'usage ancien, le pourcentage urbain, la superficie et la date de création), nous avons réalisé une Analyse Factorielle des Données Mixtes (AFDM). Cette méthode permet d'analyser un jeu de données contenant des variables quantitatives (pourcentage urbain, superficie) et qualitatives (l'usage ancien et la date de création de l'espace vert). Cette méthode fonctionne comme une Analyse en Composantes Principales (ACP) concernant les variables quantitatives et comme une Analyse des Composantes Multiples (ACM) pour les variables qualitatives (Pagès, 2004). Les packages suivants ont été utilisés : FactoMineR pour l'analyse et Factoextra pour la visualisation des données (Pagès, 2004).

2.3.3. Analyse des co-occurrences

Dans un premier temps nous avons réalisé une analyse de co-occurrence permettant de quantifier la nature des associations entre les différentes espèces : positives, négatives ou aléatoires (Griffith et al., 2016). Si une espèce A et une espèce B sont toutes les deux présentes dans un nombre de parcelles plus élevé qu'attendues par le hasard, elles auront un score de co-occurrence positif. A l'inverse, si une espèce A et une espèce B sont moins simultanément présentes qu'attendues par le hasard, elles auront un score de co-occurrence négatif. Enfin, si aucun de ces cas ne se présente, on considère que l'association entre l'espèce A et l'espèce B est aléatoire.
Cette analyse permet donc d'identifier si des espèces sont moins présentes qu'attendues par le hasard dans des parcelles colonisées par *Tapinoma darioi.* Toutefois, cette méthode ne permet pas à elle seule de découpler l'impact négatif potentiel de *T. darioi* des différences entre les sites, notamment en termes de variables environnementales. Elle est complémentaire aux autres étapes de l'analyse.

Les co-occurrences ont été calculées à partir du package cooccur (Griffith et al., 2016).

2.3.4. Effets purs de la présence de *Tapinoma darioi* sur la myrmécofaune

Dans un second temps, nous avons testé formellement la réponse des communautés de fourmis à la présence de *Tapinoma darioi*. Afin de séparer l'effet pur de *T. darioi*, nous avons

supprimé/corrigé avec l'effet des 4 co-variables environnementales espaces verts décrites plus haut : le pourcentage urbain, la superficie, l'usage ancien et la date de création en utilisant des méthodes différentes selon la nature des analyses (univariées ou multivariées).

2. 3.4.1 Réponse de la richesse spécifique et de l'abondance

Nous avons analysé séparément la réponse de la richesse spécifique et de l'abondance à l'effet pur de la présence de *Tapinoma darioi* via des analyses univariées.

Pour chacun de ces deux indicateurs, nous avons réalisé un modèle linéaire avec les 4 variables environnementales comme variables explicatives. Nous avons ensuite extrait les résidus de ce modèle, qui par définition représentent la part non expliquée par ces 3 variables, pour tester l'effet pur de la présence de *Tapinoma darioi* (Crawley, 2009).

2.3.4.2 Réponse de la structure des communautés

Afin d'analyser l'effet pur de la présence de *Tapinoma darioi* sur la structure des communautés, nous avons utilisé une analyse multivariée contrainte : l'analyse canonique des correspondances partielles (ACCp) (Cushman & McGarigal, 2002). Contrairement à des analyses multivariées classiques comme les ACP ou les Analyses Factorielles des Correspondances (AFC), les analyses multivariées contraintes permettent d'étudier l'effet d'un tableau de mesures environnementales sur un tableau de comptage d'espèces et d'estimer sa significativité à l'aide d'un test de permutation de Monte Carlo (1000 permutations dans notre cas) (Oksanen et al., 2013). De très nombreuses méthodes existent et l'ACC a l'avantage d'être plus adaptée à des tableaux de contingences (Legendre & Gallagher, 2001).

Dans notre cas, l'ACC est dite partielle ou ACCp puisque qu'elle permet de séparer l'effet de covariables (ici les 4 variables environnementales) de variables d'intérêts (ici la présence de *Tapinoma darioi*) via une méthode proche de celle décrite pour les analyses univariées : une première ACC considérant l'effet des 4 variables environnementales sur les communautés est effectuée puis la seconde ACC considérant l'effet de la présence de *T. darioi* est réalisée à partir des résidus de la première ACC (Oksanen et al., 2013).

Etant donné que les ACC sont très sensibles aux espèces rares (Legendre & Gallagher, 2001), *Gonioma hispanicum* et *Plagiolepis pygmaea* n'ont pas été considérées dans les analyses car elles ne sont présentes que dans une seule parcelle.

Le modèle utilisé est donc le suivant :
communautés ~ présence *T. darioi* + condition (variables environnementales).
Les ACCp ont été réalisées avec le package Vegan (Oksanen et al., 2013).

2.3.5. Comparaison des traits des fourmis

Le dernier volet de notre analyse des impacts consiste en une comparaison des traits des espèces de fourmis collectées, l'objectif étant d'identifier des espèces présentant des niches proches de celles de *Tapinoma darioi*. En cas d'impact négatif identifié dans l'étape précédente de l'analyse, cette comparaison de niche doit permettre de participer à l'expliquer et en cas d'absence d'impact, elle permet d'identifier des espèces qui présentent des traits similaires ou non avec *T. darioi* et qui peuvent être susceptibles de coexister ou d'entrer en compétition avec elle.

Une ACP a été réalisée sur une variété de sept traits morphologiques et comportementaux définis au niveau de l'individu ou de la colonie et couramment utilisés dans la littérature (Arnan et al., 2014): l'omnivorie, la consommation de miellat de pucerons, la taille des ouvrières inférieure à 5mm, la polygynie (présence de plusieurs reines), la présence d'ouvrières majors (ouvrières de plus grande taille avec une tête plus développée par rapport au reste du corps), l'agressivité et le polymorphisme (Tableau 4). La taille des ouvrières est prise en compte car elle constitue une caractéristique essentielle pour l'utilisation des ressources et reflète en partie la capacité de charge d'un système, c'est à dire le seuil maximal qu'un territoire donné peut tolérer sans que la ressource ou le sol ne subissent de dégradation irréversible (Gibb & Parr, 2010). Le régime alimentaire est défini ici par les traits omnivorie et consommation de miellat (liquide sucré) pour mettre en évidence le type et la quantité des ressources alimentaires recherchés (Hölldobler & Wilson, 1990). Le polymorphisme des ouvrières joue un rôle important car il permet une spécialisation efficace au sein de la colonie et donc une supériorité sur le plan compétitif (Mertl & Traniello, 2009 ; Oster & Wilson, 1976). D'ailleurs, la présence d'ouvrières majors, c'est à dire de grande taille, participe à la défense de la colonie. La polygynie représente un atout dans l'organisation sociale des fourmis. Elle joue un rôle sur la démographie, la dispersion et le mode de fondation des colonies qui se fait généralement par bourgeonnement (ce processus correspond à l'établissement d'une nouvelle colonie par une reine et quelques ouvrières qui s'installent sur de courtes distances, moins de 5 mètres en général, du nid maternel) (Keller, 1995 ; Ross & Keller, 1995 ; Rosset & Chapuisat, 2007 ; Vanderwoude et al., 2014). L'agressivité, présente chez certaines fourmis, permet l'exclusion d'autres espèces, afin notamment d'accéder aux ressources alimentaires (Arnan et al., 2012 ; Savolainen & Vepsäläien, 1988). L'ACP a été réalisée en utilisant le package FactoMineR.

Tableau 4 : Liste des 7 traits définis pour les taxons rencontrés.

Taxons (Références) Source : INPN https://inpn.mnhn.fr/	Omnivorie	Miellat de pucerons	Taille inf a 5 mm	Polygynie	Pres majors	Agressivite	Polymorphisme
Formica rufibarbis **(Fabricius, 1793)**	1	1	0	1	0	1	1
Lasius niger **(Linnaeus, 1758)**	1	1	1	0	0	1	1
Messor barbarus **(Linnaeus,1767)**	0	0	0	0	1	0	1
Messor structor **(Latreille, 1798)**	0	0	0	1	1	0	1
Monomorium monomorium **(Bolton, 1987)**	1	0	1	1	0	0	0
Pheidole pallidula **(Nylander, 1849)**	1	0	1	1	1	1	1
Tapinoma darioi **(Seifert et al., 2017)**	1	1	1	1	0	1	1
Tapinoma madeirense **(Forel, 1895)**	1	1	1	1	0	0	0
Tetramorium sp. **(Mayr, 1855)**	1	0	1	1	0	1	1

3. Résultats

3.1 Description des communautés

463 fourmis ont été récoltées et identifiées dans les 97 pièges récupérés (3 des 100 pièges ont été détruits, la cause est inconnue). Ces fourmis représentent 12 taxons différents (Tableau 5) : 7 Myrmicinae (62% des spécimens capturés), 3 Formicinae (17% des spécimens) et 2 Dolichoderinae (21% des spécimens). En moyenne 1,8 ± 0,8 taxons ont été capturés par piège. La richesse spécifique moyenne par parcelle est de 4,2 ± 1,2 taxons (Figure 37).

Tableau 5 : Liste des taxons échantillonnés dans les différentes parcelles, nombre de parcelles où le taxon a été collecté, nombre de pièges où il a été collecté, nombre d'individus collectés et pourcentage d'individus capturés.

Noms du Taxon (références)	Nombre de parcelles où le taxon a été collecté	Nombre de pièges où le taxon a été collecté	Nombre d'individus collectés	Pourcentage d'individus capturés
Tapinoma darioi (Seifert et al., 2017)	4	20	103	22,2%
Pheidole pallidula (Nylander, 1849)	7	30	91	19,6%
Lasius niger (Linnaeus, 1758)	4	15	69	14,9%
Tetramorium sp. (Mayr, 1855)	6	24	62	13,4%
Solenopsis fugax (Latreille, 1798)	3	8	44	9,5%
Tapinoma madeirense (Forel, 1895)	4	10	28	6%
Messor barbarus (Linnaeus,1767)	4	11	19	4,1%
*Goniomma hispanicum (*André, 1883)	1	5	19	4,1%
Formica rufibarbis (Fabricius, 1793)	5	8	11	2,4%
Messor structor (Latreille, 1798)	5	5	10	2,2%
Monomorium monomorium (Bolton, 1987)	2	4	6	1,3%
Plagiolepis pygmaea (Latreille, 1798)	1	1	1	0,2%

Les 3 taxons les plus capturés sont *Tapinoma darioi* (22%), *Pheidole pallidula* (20%) et *Lasius niger* (15%). L'espèce *Plagiolepis pygmaea* est celle qui est la moins collectée (Tableau 5).

La figure 37 représente la répartition des taxons entre les parcelles. On remarque que les parcelles avec *Tapinoma darioi* hébergent aussi et chaque fois *Pheidole pallidula* et de

Messor barbarus, cette dernière espèce n'apparaissant pas dans les sites sans *T. darioi.* De plus*, Lasius niger* est souvent observée dans les parcelles sans *T. darioi* (4/6 parcelles).

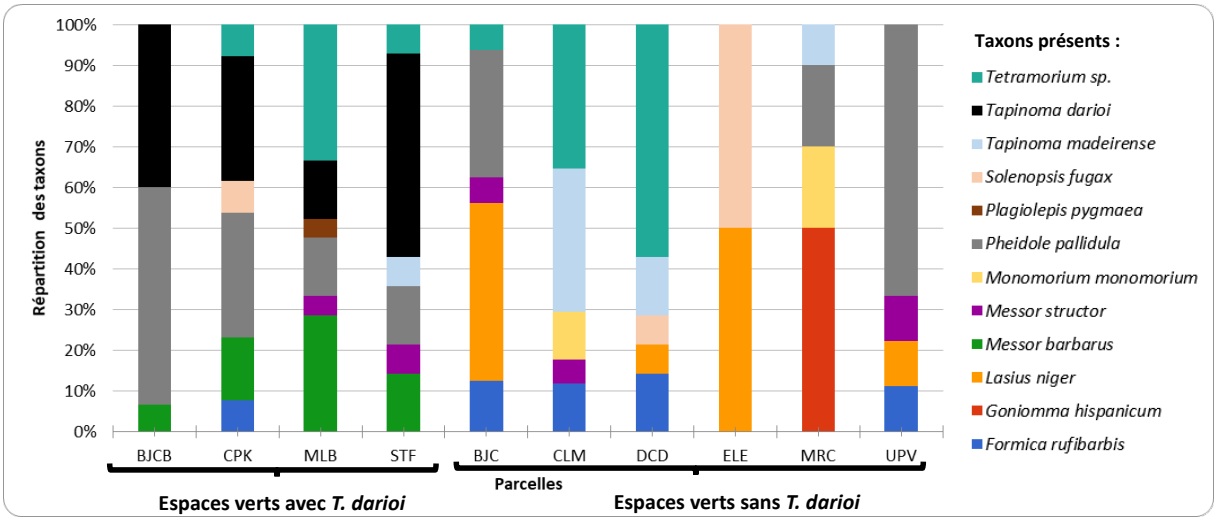


Figure 37 : Répartition des taxons en fonction des parcelles.

3.2 Comparaison des espaces verts urbains étudiés

D'après l'AFDM les variables « superficie » et « pourcentage urbain » sont corrélées (Figure 38). Pour la suite des analyses nous avons donc conservé seulement le pourcentage urbain, l'usage ancien et la date de création. L'ensemble de ces variables a donc pu être intégré dans l'analyse qui nous montre la distribution des espaces verts urbains de Montpellier (Tableau 3 ; Figure 39). Les espaces verts choisis ne sont pas similaires, plusieurs groupes sont observés : le Parc Clémenceau, l'Esplanade de l'Europe et le Parc Méric d'une part, caractérisés par leur ancienneté et un usage naturel précédant leur création ; le Bassin Jacques Cœur, le Parc George Charpak et Malbosc dont la création date de la période 2002-2008 et dont l'usage antérieur à leur création était agricole et enfin un dernier groupe composé de l'Université Paul Valéry, du Parc Dioscoride et Saint Fiacre créés en 2010-2015 et dont l'usage antérieur était artificiel. On remarque également que les espaces verts où *Tapinoma darioi* est retrouvée semblent être moyennement récents (>2002), avec un usage ancien artificiel ou agricole. *Tapinoma darioi* n'est en tout cas pas retrouvée dans les espaces verts antérieurs à 1994 et avec un usage de sol ancien naturel.

La réalisation de polygones regroupant les sites avec et sans *Tapinoma darioi* semble indiquer qu'il n'y a pas de différence entre ces deux types de sites (Figure 39). Les sites sans *T. darioi* semblent être plus hétérogènes au regard des variables prises en compte.

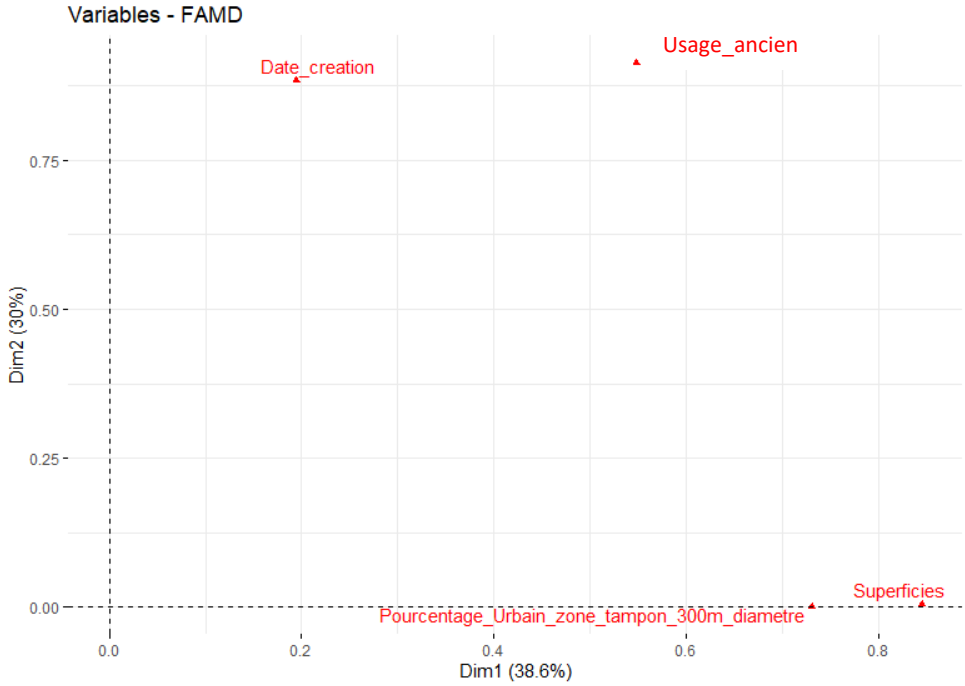


Figure 38 : Analyse Factorielle de Données Mixtes (AFDM) montrant la relation entre les quatre variables des espaces verts étudiés.

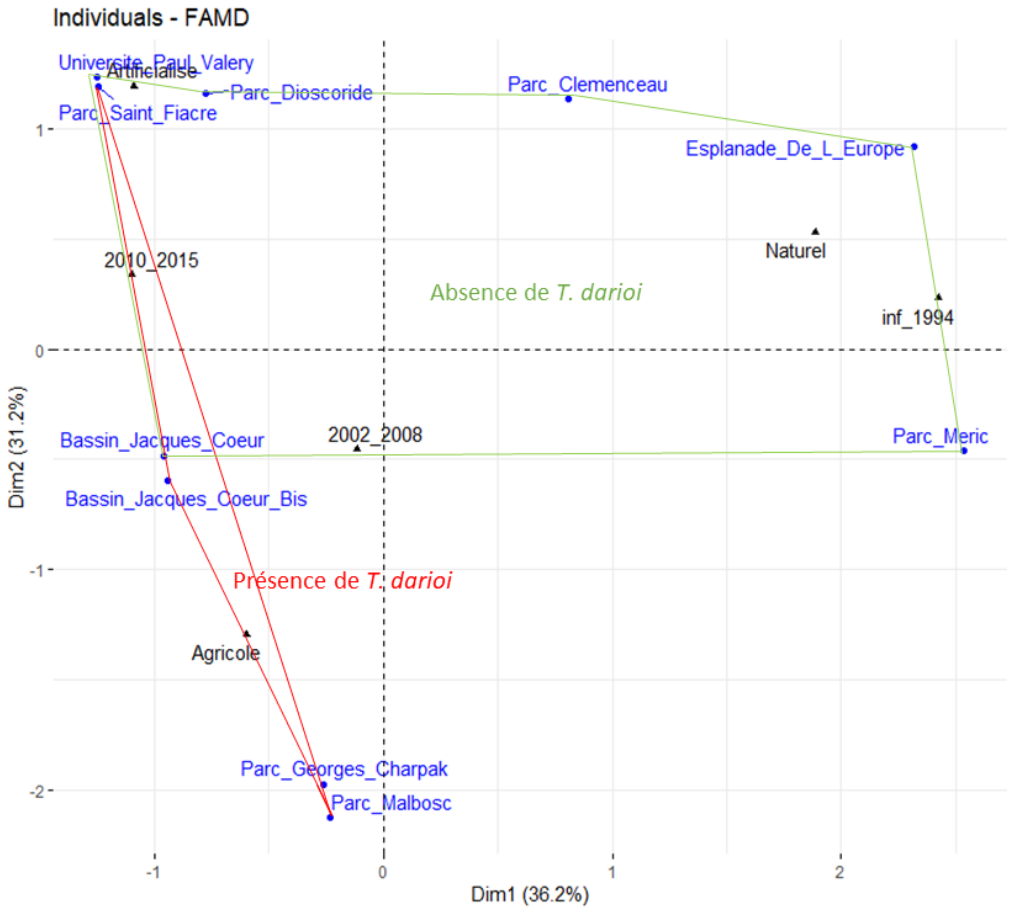


Figure 39 : Analyse Factorielle des Données Mixtes (AFDM) représentant les espaces verts urbains de Montpellier et leurs caractéristiques avec le nom des espaces verts en bleu, les variables en noir et les polygones en rouge et vert pour représenter les espaces verts avec et sans *Tapinoma darioi* respectivement.

3.3 Analyse des co-occurrences

L'analyse de co-occurrence montre que la majorité des relations sont aléatoires à l'exception d'une co-occurrence positive entre *Tapinoma darioi* et *Messor barbarus* (Figure 40).

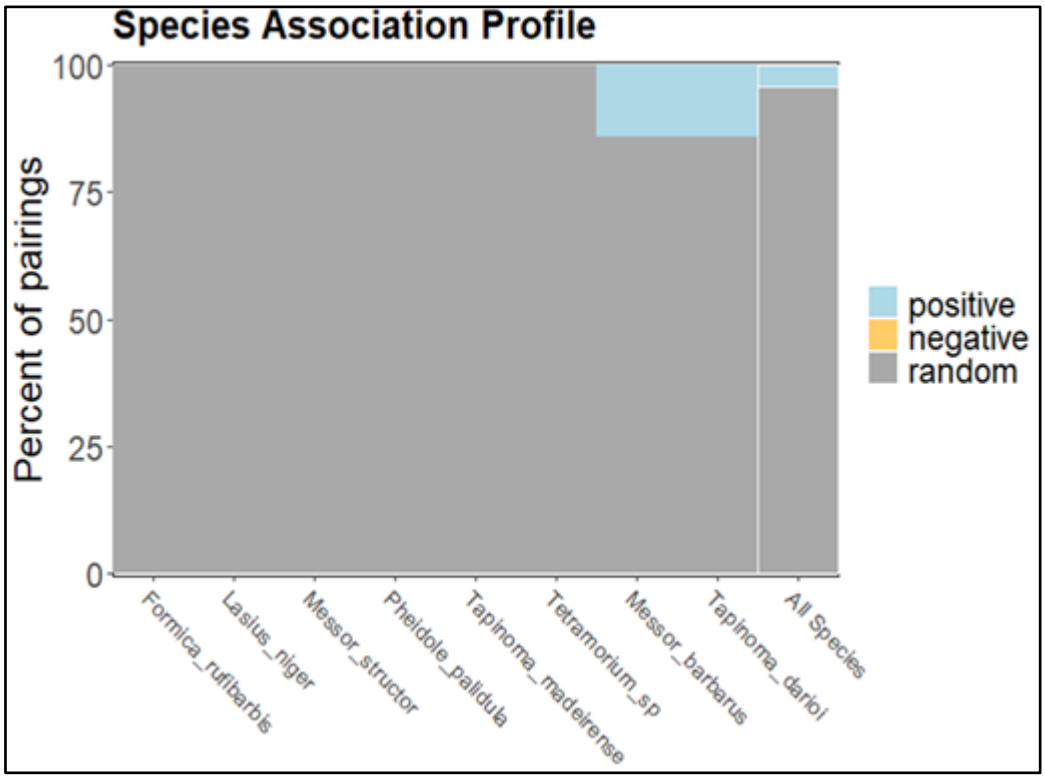


Figure 40 : Représentation graphique (diagramme en barres) montrant le pourcentage des associations (positives, négatives ou aléatoires) pour chaque taxon prélevé dans les espaces verts étudiés. La barre la plus à droite représente les pourcentages pour l'ensemble des taxons.

3.4. Effet pur de la présence de *Tapinoma darioi* sur la myrmécofaune

3.4.1. Effet sur la richesse spécifique et l'abondance

Les modèles linéaires réalisés pour l'abondance (p-value = 0,267 et un R^2 = 0,044) et pour la richesse spécifique (p-value = 0,331 et R^2 = 0,008) ont mis en évidence un effet non significatif de la présence de *Tapinoma darioi*.

3.4.2 Effets sur la structure des communautés

L'ACCp réalisée sur les communautés de fourmis n'a pas mis en évidence d'effet significatif de la présence de *Tapinoma darioi* (n = 999, Test de Monte Carlo, p-value = 0,096). D'ailleurs, l'effet pur de la présence de *T. darioi* sur la structure des communautés n'explique que 21 % de l'inertie totale (0,7 % sur l'axe 1 et 21 % sur l'axe 2, Figure 41) alors que les trois variables environnementales expliquent 74 % de l'inertie totale.

Sur la Figure 41, on observe que les communautés des espaces verts avec *Tapinoma darioi* sont caractérisées par la présence de *Messor barbarus*, ce qui confirme notre résultat

précédent sur la co-occurrence. A contrario, les sites sans *Tapinoma darioi* sont définis par les autres espèces.

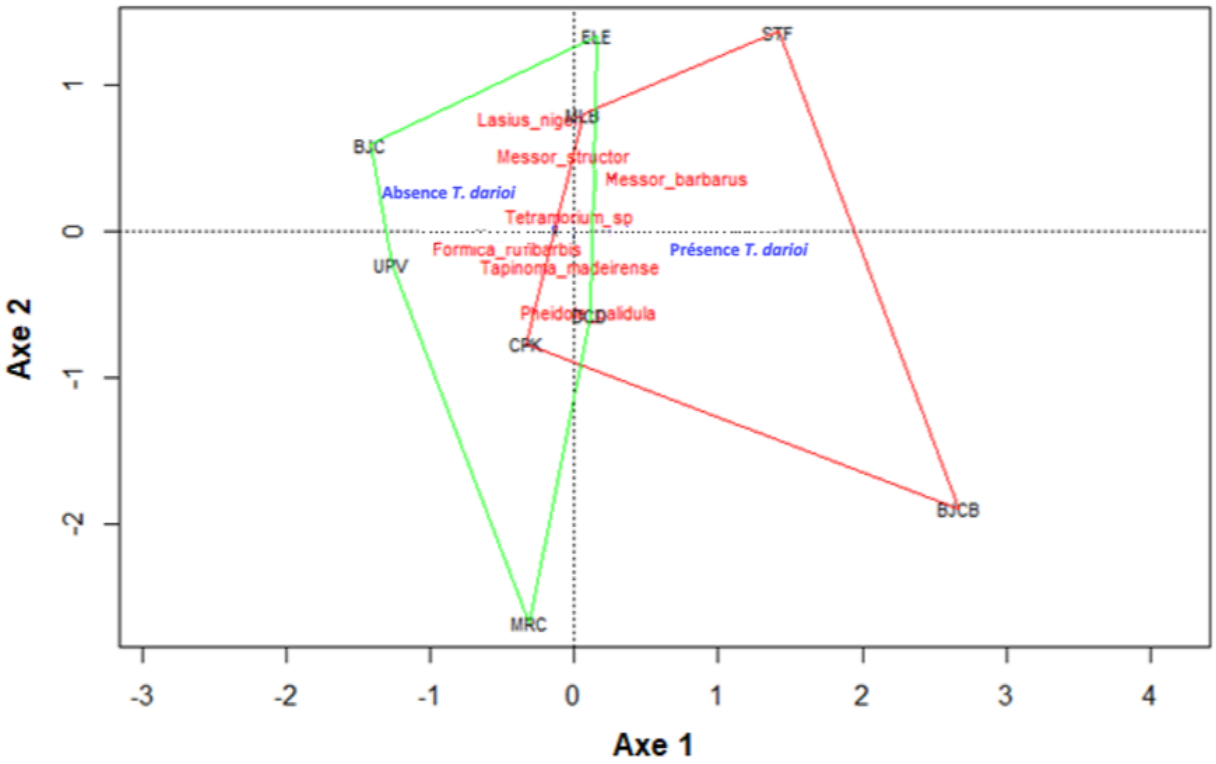


Figure 41 : Représentation graphique du modèle de l'ACCp partielle. Les variables en bleu définissent les espaces verts avec présence ou absence de *T. darioi*. Les noms en rouges représentent les taxons. Le polygone vert regroupe les espaces verts, nommés par leurs abréviations, sans *Tapinoma darioi* ; à l'inverse du polygone rouge qui réunit les espaces verts, nommés par leurs abréviations, avec les *Tapinoma darioi*.

3.5. Analyse des traits des fourmis

L'ACP réalisée montre une forte structuration des 7 traits utilisés avec 45,33 % de l'inertie sur l'axe 1 et 24,66 % de l'inertie sur l'axe 2 (soit un total de 70% sur le plan axe 1- axe 2, Figure 42). L'axe 1 peut être interprété comme un gradient de taille et de régime trophique opposant deux grandes espèces avec des fourmis majors et granivores comme *Messor barbarus* et *M. structor* à un groupe d'espèces de taille inférieure à 5 mm et omnivores comme *T. darioi*, *T. madeirense*, *Tetramorium sp.* ou *Lasius niger*.

L'axe 2 est un gradient de polymorphisme et d'agressivité qui va opposer des espèces agressives comme *Tapinoma darioi* et *L. niger* à *T. madeirense*, *M. monomorium*.

La majorité des espèces comme *Lasius niger, P. pallidula ou Tetramorium sp.* apparait proche de *T. darioi* vis-à-vis des traits alors que les *Messor* sont très éloignées.

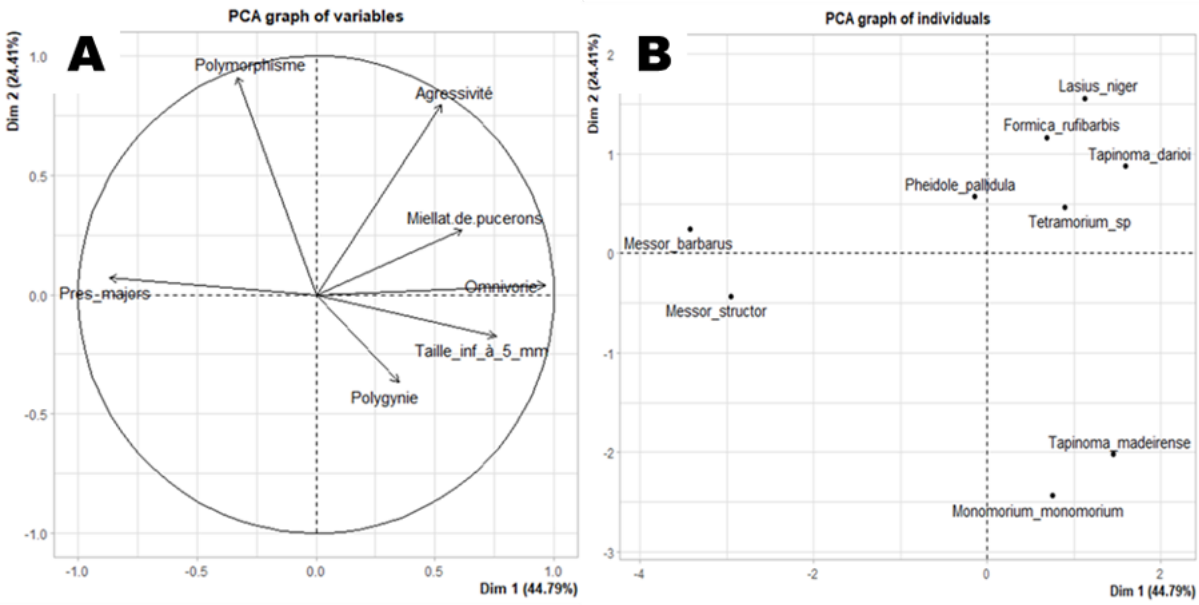


Figure 42 : ACP représentant A) les traits et B) les taxons étudiés.

4. Discussion

Description de la myrmécofaune

Les communautés de fourmis échantillonnées dans les espaces verts sélectionnés sont composées d'espèces assez communes au sud de la France comme *Messor barbarus* que l'on rencontre dans les milieux ouverts ainsi que dans les milieux urbains, ou comme *Pheidole pallidula,* qui apprécie les milieux anthropisés, par exemple les espaces verts ou les trottoirs (Blatrix et al., 2013 ; Detrain et al., 1990). Ces espèces sont également retrouvées dans d'autres pays méditerranéens (Blatrix et al., 2013 ; Detrain et al., 1990). *Tapinoma madeirense* tout comme *Formica rufibarbis* sont des espèces très communes dans toute la France, rencontrées généralement en milieux ouverts, on peut aussi les observer dans les sites anthropisés tels que les jardins ou les pelouses (Blatrix et al., 2013). *Messor structor* est également une espèce assez commune en France que l'on observe surtout dans les milieux assez ouverts (Blatrix et al., 2013). *Lasius niger*, la fourmi noire des jardins, est une espèce dominante de fourmis urbaines en Europe qui s'est adaptée avec succès aux conditions urbaines (Blatrix et al., 2013 ; Konorov & Nikitin, 2015 ; Konorov, 2018) ; elle semble toutefois être moins présente dans le sud de la France (Blatrix et al., 2013). *Monomorium monomorium,* plus rare en France, peut être trouvée dans les milieux ouverts aux abords des étangs proches du littoral et parfois au niveau des bouches d'égout (Baugnée & Godeau, 2000 ; Blatrix et al., 2013). L'ensemble des espèces rencontrées est retrouvé en milieux urbains et naturels notamment dans ceux avec une faible hauteur herbacée comme les prairies (Blatrix et al., 2013).

Tetramorium sp. est observée dans trois parcelles avec *Tapinoma darioi*, mais elle n'a pas été identifiée à l'espèce. Il pourrait donc s'agir soit de *Tetramorium forte* retrouvée dans le sud de la France mais qui est peu commune, soit de *Tetramorium* du groupe

caespitum/impurum très fréquente dans toute la France avec des ouvrières très agressives, soit de *Tetramorium semilaeve* assez commune dans le sud de la France (Blatrix et al., 2013).

Effet de la présence de *Tapinoma darioi* sur la myrmécofaune

Contrairement à notre hypothèse, nous n'avons pas observé d'impact de *Tapinoma darioi* sur le reste de la myrmécofaune. En effet, les fourmis invasives sont compétitrices et composées de supercolonies qui peuvent s'étendre sur plusieurs hectares comme c'est le cas pour la fourmi d'Argentine *L. humile* par exemple (Holway et al., 2002). Les zones occupées par les fourmis invasives sont souvent caractérisées par une faible abondance et diversité d'espèces indigènes (Porter & Savignano, 1990 ; Suarez et al., 1998 ; Wittman, 2014). Ainsi, en Suisse, Gippet et al. (2022), ont montré que la richesse et l'abondance de la myrmécofaune indigène était significativement plus faible en présence de *T. magnum*, autre espèce du complexe *T. nigerrimum*.

Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer notre résultat et, plus spécifiquement, les différences observées avec l'étude conduite en Suisse :

- Les niveaux d'invasion de *T. darioi,* à Montpellier et ses alentours, sont actuellement faibles, cela peut être dû à une invasion récente en cours. Effectivement *T. darioi* est retrouvée dans les sites moyennement récents (>2002), il est donc possible qu'avec le temps on observe un effet sur la myrmécofaune. De plus, on remarque que *T. darioi* n'est pas trouvée dans les sites avec un usage de sol ancien naturel, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que ces espaces verts devaient avoir une entomofaune plus riche ce qui peut être moins favorable à *T. darioi*. La végétation étant déjà en place sur ces sols naturels peu dégradés, on suppose donc que l'aménagement a probablement peu occasionné de transfert de terre et de végétaux engendrant donc moins de risque d'introduction de *T. darioi*. D'après Cadotte et al. (2017), si le chevauchement de niche est important, il y aura une concurrence intense et c'est l'espèce dont la croissance moyenne est la plus haute qui pourra supplanter l'autre.

- Certaines études ont montré que les espèces de fourmis indigènes pouvaient persister dans des zones fortement occupées par les fourmis invasives (Gippet et al., 2022 ; Tartally, 2006 ; Vonshak et al., 2010 ; Wittman, 2014). En effet, certaines espèces locales comme *Pheidole pallidula* ou encore *Lasius niger* ont des comportements dominants et peuvent monopoliser les ressources (Gippet et al., 2022). Par exemple, *Lasius niger* est un compétiteur difficile et limite le succès de recherche de nourriture pour la fourmi d'Argentine (Cordonnier et al., 2020). Elles peuvent ainsi résister et déranger la propagation d'espèces invasives (Gippet et al., 2022). C'est le cas notamment pour l'espèce invasive *Lasius neglectus* (Gippet et al., 2022).

- Dans l'étude de Gippet et al. (2022), la méthode utilisée était celle des appâts, consistant à déposer de la nourriture (miel et thon) dans des tubes, permettant d'étudier la dominance, alors que nous avons utilisé des pièges Barber qui permettent d'analyser l'abondance et la diversité des communautés. Il est possible que *Tapinoma darioi* est un comportement dominant de par sa prolifération et par un potentiel comportement agressif, sur les autres espèces à l'exception de certaines, comme *Messor barbarus,* qui cohabite car elle possède une niche différente. Les espèces dominantes se caractérisent par une agressivité et monopolisent les territoires et les ressources alimentaires. Elle peut être définie de manière numérique et comportementale (Parr & Gibb, 2010). Cet effet n'est pas suffisamment fort cependant pour exclure une ou des espèces des parcelles et donc impacter la richesse. Il serait intéressant de réaliser une expérimentation similaire dans notre zone d'étude.

- Enfin, d'après Seifert et al. (2017), *Tapinoma magnum* a présenté le plus fort potentiel invasif des espèces du complexe. Effectivement, ils montrent que cette espèce est plus répandue actuellement que *T. darioi*, car elle a été observée hors de son aire d'origine, en Allemagne, en Belgique et aux Pays-Bas et présente déjà des impacts locaux (Dekoninck et al., 2015 ; Heller, 2011 ; Seifert et al., 2017). Il serait intéressant de comprendre pourquoi *T. darioi* est beaucoup plus fréquente que *T. magnum* sur nos sites (Chapitre 1). Des expériences comparant les niches des deux espèces sur notre zone d'étude sont en cours au laboratoire (Blatrix & Vergnes, Comm. Pers.).

Analyse des traits des fourmis

L'analyse sur les traits des fourmis permet de mieux comprendre la présence des fourmis indigènes avec *Tapinoma darioi*.

Notre étude a montré que seule la relation entre *Messor barbarus* et *Tapinoma darioi* était positive d'après l'analyse sur la co-occurrence. Effectivement l'ACP a permis de montrer que ces deux espèces possèdent des traits différents (Figure 42). Elles ont notamment un régime alimentaire distinct et donc des niches alimentaires propres ce qui peut expliquer ce résultat. Effectivement, *Tapinoma darioi* est omnivore avec un régime alimentaire plus varié allant du miellat d'hémiptères aux petits invertébrés alors que les fourmis moissonneuses, *Messor barbarus,* sont connues dans la région méditerranéenne pour leur consommation essentiellement granivore et leur dispersion de graines (Cerdá et al., 1989 ; Detrain et al., 2000). On peut ainsi supposer que la compétition serait limitée ce qui pourrait permettre leur cohabitation étant donné qu'elles n'exploitent pas les mêmes ressources. Il est montré, effectivement, que les espèces qui coexistent ont fréquemment des lieux d'alimentation différents ce qui évite une concurrence excessive (Li et al., 2014). Chaque espèce a une niche qui lui est propre, englobant son habitat et l'utilisation de ses ressources avec diverses

interactions comme la compétition (Hutchinson & MacArthur, 2015). Par exemple les niches alimentaires résultent de différences morphologiques et comportementales entre espèces, facilitant ainsi la coexistence en réduisant la concurrence (Moreno & Carrascal, 1993). *Messor barbarus* est l'espèce qui est la plus caractéristique des parcelles échantillonnées avec la présence de *Tapinoma darioi* (Figure 40, Figure 43). Les autres interactions ont montré que la composition de nos communautés est essentiellement due au hasard.



Figure 43 : Exemple de nid de *Messor barbarus* à Montpellier. Photo : Julia Centanni.

Messor structor, que l'on retrouve plus faiblement dans les parcelles avec *T. darioi,* est moins commune que *M. barbarus*. Son régime granivore (Plowes et al., 2013) expliquerait sa présence avec *Tapinoma darioi*.

Pheidole pallidula a été observée dans une majorité de sites échantillonnés et, systématiquement, dans tous les sites occupés par *T. darioi* (Figure 37). Son agressivité particulière pourrait lui permettre de résister à l'ensemble des espèces relevées sur nos parcelles. Elle est, de plus, caractérisée par la présence au sein de sa colonie de deux formes d'ouvrières, les minors et les majors. Les majors occupent plusieurs rôles, dont la défense. Ce rôle est primordial et leur permet de s'imposer face à d'autres espèces de plus grande taille. C'est donc une espèce au comportement dominant, capable d'exclure d'autres espèces dominantes, connue pour sa combativité et pour l'agressivité de ses ouvrières

(Blatrix et al., 2013 ; Retana et al., 1992). Dans la littérature il est évoqué que *P. pallidula* peut entrer en compétition pour les ressources et qu'elle s'attaquerait avec efficacité aux ouvrières du complexe *Tapinoma nigerrimum* (Cerdá et al., 1989). Cependant il existerait un cloisonnement saisonnier entre ces deux espèces leur permettant ainsi un partage temporel des ressources (Cerdá et al., 1989). Les ouvrières du complexe *Tapinoma nigerrimum* seraient en effet plus actives au printemps-été tandis que *P. pallidula* serait active plutôt à la fin de l'été, début de l'automne (voir Figure 44) (Cerdá et al., 1989). Ce partage permettrait d'éviter une rencontre compétitive et donc la perte d'individus au sein de la colonie (Cerdá et al., 1989). L'étude de Cerdá et al. réalisée en 1989, avant la séparation du complexe *T. nigerrimum*, ne nous permet pas d'affirmer précisément quelle est l'espèce étudiée même si l'information, portant sur les supercolonies et la localisation en Espagne, laisse à penser qu'il pourrait s'agir soit de *T. ibericum*, soit de *T. darioi* soit de *T. magnum* (Chapitre 1 ; Seifert et al., 2017). La réplication de cette étude à Montpellier, à plusieurs périodes de l'année (printemps-automne) pourrait être envisagée.

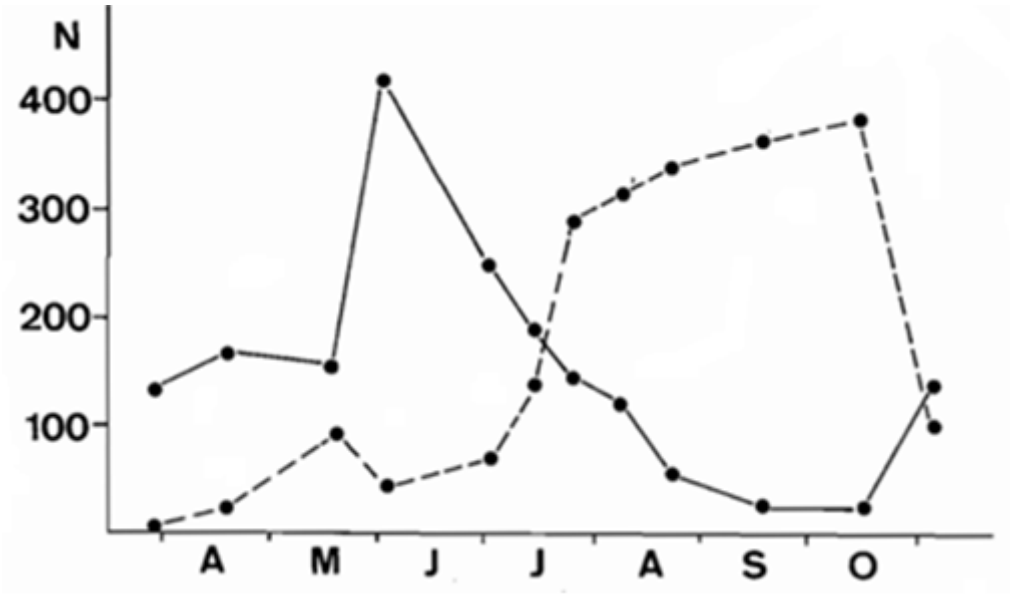


Figure 44 : Activité saisonnière de *Tapinoma nigerrimum* (ligne noire plaine) et *Pheidole pallidula* (ligne en pointillé) estimée à partir du nombre d'appâts occupés par chaque espèce chaque jour d'échantillonnage (Cerdá et al., 1989).

Lasius niger qui possède des traits similaires à *T. darioi* et *P. pallidula* n'apparait jamais dans les sites où celles-ci sont présentes. Pourtant, en Suisse, une étude a montré que cette fourmi noire des jardins avait persisté face à des densités élevées de l'espèce invasive *T. magnum* et qu'elle avait stratégiquement déplacé son activité de recherche de nourriture (Gippet et al., 2022). D'après Gippet et al. 2022, *Lasius niger* est une espèce concurrente agressive fréquente dans les paysages européens car elle est capable de monopoliser les ressources et de dominer les espèces invasives comme la fourmi d'Argentine (Blatrix et al., 2013 ; Cordonnier et al., 2020). On peut émettre l'hypothèse que *L. niger* soit une

concurrente éventuelle de *T. darioi* ce qui expliquerait sa présence sur 4 des 6 parcelles où *T. darioi* est absente (Figure 37).

Propriétés des espaces verts urbains étudiés et biais de l'étude

La ville de Montpellier regroupe de nombreux espaces verts avec des origines différentes (agricoles (vignobles, vergers …), urbains ou naturels). Ces espaces verts possèdent donc des caractéristiques variées, avec un historique propre, qui expliquent la composition différente des communautés.

La température et l'humidité sont essentielles étant donné que les fourmis sont des organismes ectothermes (Ribeiro et al., 2012). Les propriétés du sol sont des variables importantes à prendre en compte aussi pour la répartition des communautés. Il serait donc pertinent de faire une étude plus approfondie sur les variables pédologiques (comme la granulométrie ou la porosité du sol) et les caractéristiques physicochimiques (analyse de la composition du sol comme le pH, la concentration en azote, en carbone, en phosphore ou encore la concentration en éléments traces métalliques (Cu, Ni, Pb, Zn)). Cependant, ces analyses nécessitent du temps et sont onéreuses.

Concernant notre méthode d'échantillonnage, la période principale d'activité des fourmis a été ciblée, on a ainsi augmenté la probabilité de détection du plus grand nombre d'espèces. Cependant, il existe une variété de facteurs qui peut influencer la détectabilité des espèces, comme les conditions météorologiques, les caractéristiques de l'espèce ou encore les méthodes d'échantillonnages (Guillera-Arroita, 2017). L'hétérogénéité environnementale à petite échelle et microclimatique est omniprésente et joue aussi un rôle important dans la coexistence ou non d'espèces dans les parcelles (Gippet et al., 2022). De plus, d'après la littérature, les pièges Barber ne permettent pas toujours de réaliser un échantillonnage parfaitement représentatif de la richesse spécifique des sites étudiés (Majer, 1997). Dans notre cas, l'augmentation du nombre de parcelles étudiées, l'ajout de pièges Barber, ainsi qu'une pose plus longue, permettraient d'éviter les fausses absences et une sous-estimation des effectifs pour réaliser un échantillonnage encore plus représentatif de la myrmécofaune (Freitag, 2016). La mise en place d'une pression d'échantillonnage plus importante, notamment par réplications spatiales, dans différentes zones urbaines et temporelles, à d'autres saisons (plusieurs périodes dans l'année par exemple printemps et automne) permettrait de rendre notre analyse plus robuste et de maximiser la détection (Freitag, 2016 ; Gippet et al., 2022). Les études futures pourraient combiner plusieurs méthodes d'échantillonnage comme la prospection visuelle (chasse à vue), le comptage des nids dans les parcelles ou l'utilisation de pièges à appâts (cf Gippet et al., 2022).

Conclusion

Il s'agit de la première étude visant à évaluer les effets de *Tapinoma darioi* sur la myrmécofaune dans les parcelles des espaces verts urbains de Montpellier. Nos résultats

actuels ont montré que la présence de *T. darioi*, espèce invasive du complexe *T. nigerrimum* n'avait pas d'effet significatif sur la myrmécofaune. Mais cette étude reste à poursuivre dans l'avenir notamment pour les espèces possédant des traits proches qui pourraient éventuellement entrer en compétition avec elle. Nous avons également observé une seule interaction positive entre *Messor barbarus* et *Tapinoma darioi* pouvant être justifiée par des régimes alimentaires qui ne se chevauchent pas.

De nouvelles prospections plus régulières dans l'avenir nous permettraient d'obtenir un suivi de l'évolution de l'effet de *T. darioi* sur la myrmécofaune locale**.** Une reproduction de notre expérience à d'autres saisons dans différentes zones urbaines permettrait de mieux évaluer la cohérence de nos résultats.

Remerciements

Merci aux personnes ayant apporté leur contribution à cette étude ; Ambre Mautuit, Bernard Kaufmann, Rumsais Blatrix, Adeline Dumet, Olivier Blight, Pierre Jay-Robert, Alan Vergnes. Nous remercions également la Direction Patrimoine et Biodiversité (DPB) de la ville de Montpellier et plus spécifiquement Stéphanie Grosset de nous avoir permis de réaliser la pose de pièges dans les espaces verts de Montpellier. Merci également aux étudiants, Célia Lecomte et Corentin Sagnet, pour leur aide apportée sur le terrain et leur travail en laboratoire.

Discussion générale et Perspectives

1. Synthèse des résultats

L'urbanisation modifie fortement l'environnement, ce qui influence la structuration génétique de certaines espèces et contribue à l'apparition de nouvelles conditions qui les impactent différemment, certaines d'entre elles se trouvent négativement affectées par ces changements alors que d'autres, comme les espèces invasives, sont favorisées (Cadotte et al., 2017 ; Pickett et al., 1997).
Ces espèces invasives peuvent à leur tour engendrer des effets délétères sur la biodiversité. La compréhension de ces mécanismes est essentielle dans le contexte actuel de changements globaux et d'érosion de la biodiversité.

Pour permettre une étude efficace et généralisable des impacts de l'urbanisation, nous avons choisi d'étudier le complexe d'espèces de fourmis *Tapinoma nigerrimum* morphologiquement proches mais qui présentent des traits comportementaux différents (Alberti, 2015 ; Seifert et al., 2017). En effet, les arthropodes et plus particulièrement les fourmis sont de bons indicateurs pour étudier les effets de l'urbanisation (Gippet et al., 2017 ; Hunter & Hunter, 2008). Les fourmis sont souvent utilisées en tant que modèle dans l'étude des invasions biologiques. Certaines espèces de fourmis invasives causent de nombreux dommages, écologiques et économiques (Bradshaw et al., 2016 ; Holway et al., 2002 ; Suarez et al., 2000). *Tapinoma magnum* et *T. darioi* présentent un caractère invasif, forment des supercolonies polygynes pouvant contenir parfois jusqu'à 20 millions d'ouvrières et prolifèrent dans diverses zones urbanisées à l'inverse de *T. nigerrimum* qui forme des colonies monodomes plutôt dans les milieux naturels ouverts (Freitag & Cherix, 2019 ; Seifert et al., 2017).

Cette thèse s'est orientée selon 3 grands axes qui sont :
- la réalisation d'une cartographie fine afin de comprendre les effets du paysage urbain sur un complexe d'espèces de fourmis dans une zone présentant une urbanisation croissante
- l'étude fine de l'effet de l'urbanisation sur la structuration des espèces présentes dans la zone d'étude
- l'analyse des conséquences de la présence d'une espèce invasive dans les espaces verts urbains Montpellierains.

Dans le chapitre 1 de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés à la distribution des espèces du complexe *Tapinoma nigerrimum* à Montpellier et ses alentours. Grâce à une cartographie fine nous avons pu montrer que deux des espèces du complexe y sont observées fréquemment : *Tapinoma nigerrimum* et *Tapinoma darioi*. *Tapinoma magnum*, quant à elle, n'a été que très peu trouvée. Nous avons ensuite pu mettre en évidence une sensibilité différente des espèces à cette urbanisation. En effet, *T. darioi,* est favorisée par l'urbain jusqu'à un certain seuil. *Tapinoma nigerrimum* est trouvée plutôt dans les milieux naturels et est moins présente dans les zones urbanisées (Figure 45). Nos résultats

soulignent l'importance de ne pas étudier uniquement les effets linéaires de l'urbanisation, car, en effet, au-delà d'un certain seuil, elle n'est favorable ni à l'une ni à l'autre.

Dans le chapitre 2, nous avons affiné notre analyse sur les espèces présentes dans la zone d'étude en analysant cette fois-ci l'effet de l'urbanisation sur la structuration génétique intraspécifique. Les résultats n'ont pas montré d'effet du paysage urbain sur la structuration génétique de *Tapinoma nigerrimum*, les structures génétiques antérieures à l'urbanisation pourraient estomper tout impact. Deux groupes sont observés à Montpellier à l'est et à l'ouest, avec une zone d'hybridation au nord-est nécessitant un échantillonnage supplémentaire pour comprendre cette structuration. Concernant *T. darioi,* on observe un mélange de supercolonies d'origines différentes, y compris locales, qui coexistent sur le territoire. Les introductions de *T. darioi* peuvent être dues au fait que le paysage étudié est situé dans l'aire de distribution de l'espèce. Des populations génétiquement apparentées sont retrouvées dans les villes du sud de la France et en Italie d'une part et d'autre part le long de la côte méditerranéenne de la péninsule Ibérique suggérant une introduction à Montpellier ou une exportation vers les pays ou régions cités prouvant le rôle de l'homme dans la dispersion de cette espèce (Figure 45).

Dans le chapitre 3, nous avons étudié l'impact potentiel de *T. darioi* sur la myrmécofaune dans les espaces verts urbains Montpelliérains. Notre analyse, effectuée à l'aide de pièges Barber, nous a permis de montrer qu'à ce jour, *T. darioi* ne présentait pas d'effet visible sur la myrmécofaune mais des espèces possédant des traits similaires ou non pourraient éventuellement entrer en compétition ou à l'inverse coexister avec elle. Dans ce chapitre, nous avons également mis en évidence que *Messor barbarus* coexistait avec *T. darioi*, probablement en raison d'un régime alimentaire différent, évitant par conséquent un chevauchement de niche (Figure 45).

2. Discussion

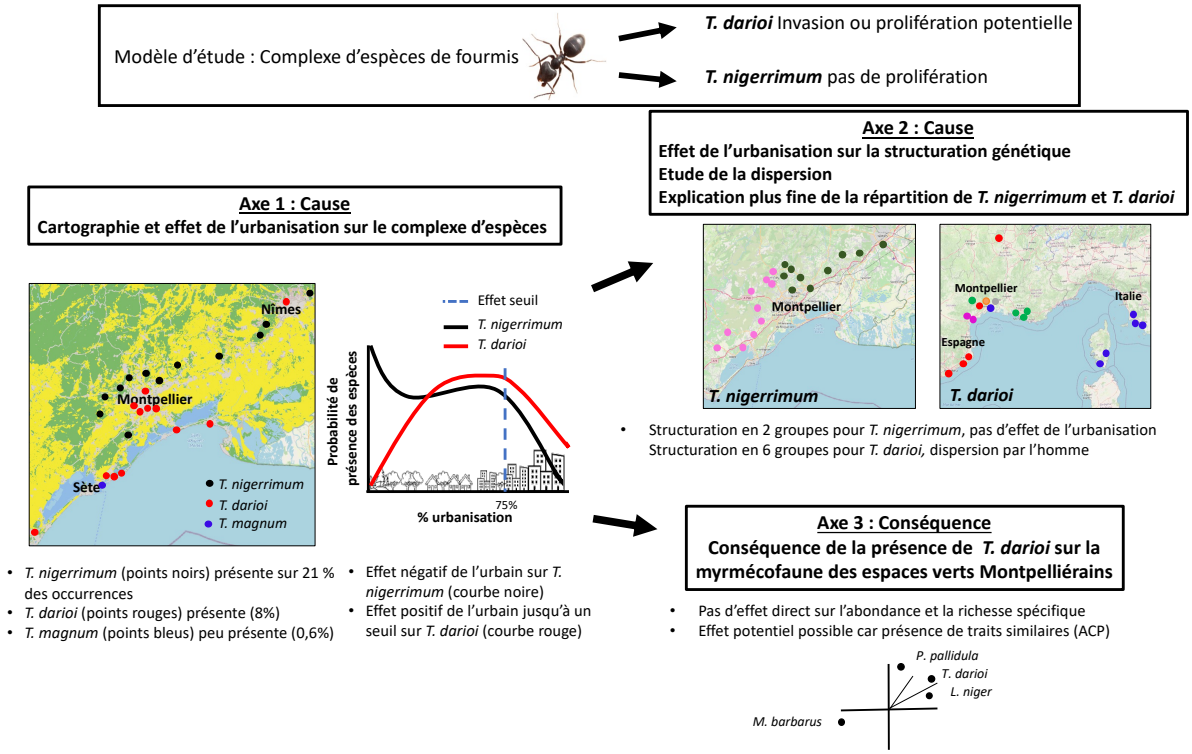


Figure 45 : Schéma bilan représentant le lien entre les différentes parties de la thèse.

Axe 1 : Lien entre urbanisation et invasion

L'urbanisation engendre des effets sur la biodiversité (Grimm et al., 2008). De nombreuses espèces évitent ce nouvel environnement car elles ne peuvent pas survivre dans cet écosystème, on parlera alors d'espèces *urban avoiders* (Blair, 1996). D'ailleurs, dans un premier temps, la majorité des écologistes avaient émis l'hypothèse que les espèces réagiraient négativement aux environnements urbains (McDonnell et al., 1993). Cependant, d'autres espèces tolèrent ces nouvelles conditions et sont même parfois favorisées, on parle cette fois d'*urban adapters* ou *exploiters* (Blair, 1996 ; McKinney, 2002). Ces espèces sont souvent des espèces invasives (Cadotte et al., 2017).

Les écosystèmes moins perturbés seraient plus résistants aux invasions biologiques que les écosystèmes urbains (Moles et al., 2012). En effet, ces derniers offrent des opportunités uniques à ces espèces (Cadotte et al., 2017) car ils présentent une combinaison de conditions environnementales particulières comme par exemple des températures plus fortes ou des sols modifiés (Wilby & Perry, 2006). La compétition réduite avec moins de concurrents dans les villes peut être favorable à l'installation de certaines espèces (Cadotte et al., 2017). Et enfin, les fréquents déplacements de personnes et de marchandises entre les villes facilitent par la même occasion la dispersion de ces divers organismes, allant de l'importation accidentelle à intentionnelle (Cadotte et al., 2017 ; Mack & Lonsdale, 2001).

Pour étudier l'effet de l'urbanisation sur les différentes espèces une approche avec gradient est abordée (McDonnell & Hahs, 2008). Ainsi, l'utilisation de modèles statistiques, pas seulement linéaires mais aussi quadratiques et cubiques sont importants pour évaluer de manière efficace ses effets et détecter les éventuels seuils (Cadotte et al., 2017 ; McDonnell & Hahs, 2008). En effet, les espèces répondent rarement de manière linéaire le long des gradients d'urbanisation qui peuvent être définis avec des niveaux de précision différents, comme la proportion de surfaces imperméables, ce qui fournit une mesure plus précise des zones urbaines (McDonnell & Hahs, 2008 ; McKinney, 2008). Ces mesures sont aujourd'hui trouvées dans la littérature pour de nombreux organismes comme les oiseaux, les plantes, les insectes (Egerer et al., 2017 ; McDonnell & Hahs, 2008 ; Seress et al., 2014).

Dans notre étude nous avons essayé de mieux comprendre les effets de l'urbanisation dans le chapitre 1 (Centanni et al., 2022) et nous avons montré que les espèces du complexe *Tapinoma* n'ont pas répondu de manière linéaire à l'urbanisation. Un effet de seuil, situé aux niveaux élevés d'urbanisation, a été observé à partir duquel l'urbain s'est révélé néfaste pour les deux espèces du complexe (Centanni et al., 2022). L'espèce invasive *T. darioi* a répondu positivement à l'urbanisation jusqu'à un seuil de 75% d'urbanisation, le lien entre l'urbanisation et l'invasion est donc plus complexe et la prise en compte uniquement d'un modèle linéaire n'aurait pas mis en avant cette même réponse. Vergnes et al. (2014) ont également montré un effet négatif de l'urbanisation à partir d'un certain seuil sur les araignées, les carabes et les staphylins en Ile de France. D'autres auteurs ont étudié les effets de l'urbanisation sur les fourmis. Par exemple Cordonnier et al. (2019) ont observé une réponse contrastée entre *Tetramorium immigrans* qui était fortement associée à l'urbain et que l'on pourrait qualifier d'*urban exploiter* par rapport à *T. caespitum* qui serait plutôt un *urban avoiders*. Gippet et al. (2017) ont constaté que certaines espèces étaient plus tolérantes à l'urbain, comme la fourmi noire des jardins *Lasius niger* ou encore l'espèce invasive *Lasius neglectus*. Ainsi l'urbanisation doit être quantifiée efficacement, il est donc essentiel de réaliser des mesures qui ne soient pas seulement linéaires afin de bien comprendre comment l'urbanisation influence les espèces (Cadotte et al., 2017).

Axe 2 : Dispersion des espèces du complexe

Dans le deuxième chapitre, nous avons pu utiliser les données du chapitre 1 et montrer que l'urbanisation ne jouait pas de rôle de barrière dans la structuration génétique de *T. nigerrimum* qui semble dispersée par le vol. Au contraire, la dispersion de *T. darioi* semble être assurée par les activités humaines.

Dispersion naturelle

La dispersion des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* est encore mal connue (Seifert et al., 2017). Les fourmis invasives sont généralement associées au mode de dispersion par bourgeonnement, c'est le cas de la fourmi *Wasmannia auropunctata* (Vanderwoude et al., 2014). Ainsi, c'est ce mode de dispersion qui pourrait correspondre aux

fourmis invasives du complexe, limitant ainsi leur déplacement naturel et nécessitant la dispersion via les activités humaines pour coloniser des zones plus lointaines (Seifert et al., 2017). Cependant, étant donné le peu de connaissances dont nous disposons, on ne peut exclure une dispersion par les femelles volantes lors des vols nuptiaux comme cela est observé pour *Tapinoma sessile*, une autre espèce de fourmi invasive (Blumenfeld et al., 2021). Seule *Tapinoma nigerrimum* semble présenter une dispersion par le vol.

Afin d'améliorer nos connaissances sur les capacités de vol, l'analyse de mesure de distances parcourues serait intéressante à réaliser. L'étude de la capacité de déplacement des individus sexués permettrait, par exemple, de mieux comprendre les effets de la fragmentation. Plusieurs méthodes complémentaires existent pour étudier la dispersion des insectes, la plus connue et utilisée étant la méthode par Captures-Marquages-Recaptures (CMR) qui permet d'obtenir des informations sur la dispersion en condition naturelle (Ranius & Hedin, 2001). Elle dépend néanmoins de la répartition des échantillonnages et du taux de recapture. Le radiopistage est une autre méthode consistant à poser un radio-émetteur sur l'insecte étudié et à suivre son parcours (Hedin & Ranius, 2002). Le poids du dispositif limite cependant son utilisation à de gros insectes et le rend donc difficilement transposable à des fourmis.

Le moulin ou manège de vol (Figure 46) constitue une méthode indirecte alternative qui semblerait plus adaptée aux *Tapinoma* et permettrait d'étudier leur potentiel de vol. Ce dispositif est utilisé régulièrement en entomologie dans l'objectif d'évaluer les capacités de vol d'insectes ailés notamment ceux de petites tailles ; la durée et la vitesse du vol ainsi que la distance parcourue peuvent ainsi être mesurées (Naranjo, 2019). Facile à construire et peu coûteux, il serait adapté aux espèces étudiées. L'expérimentation a déjà été réalisée entre autres sur un insecte coléoptère *Monochamus galloprinvicialis* (David, 2014) et s'est également avérée efficace pour des bousiers (Perrin, 2019) et pour des reines de fourmis de *Lasius* et de *Tetramorium* qui ont réalisé 45 minutes de vol en continu (Blatrix & Marty, communication personnelle). Les principales difficultés rencontrées, lors de l'expérimentation menée par Blatrix & Marty, ont porté à ces occasions sur l'incitation des individus à voler pendant une durée suffisante pour pouvoir exploiter les données, mais il semble néanmoins que la présence d'un flux d'air artificiel accompagnée de la simulation de la chute de l'insecte favorise l'envole (Perrin, 2019).

Afin de tester les capacités de vol de *T. nigerrimum* qui est censée se disperser par le vol, Blatrix & Marty ont placé trois tentes à émergence (dispositif placé sur une colonie consistant à capturer les individus ailés) sur des colonies de *Tapinoma nigerrimum ss str.* sur le terrain d'expérimentation du CEFE, en juin 2019, mais aucune reine n'a été capturée. L'essaimage de cette espèce se situe aux alentours des mois de mai et juin (Seifert et al., 2017). Mais, il se peut que cette espèce essaime rarement et que la période optimale ait été manquée. L'expérimentation n'a donc pas pu être réalisée sur cette espèce. De plus, une des

contraintes est que les reines doivent être testées au moment de leur sortie de la colonie car après quelques heures dans une boîte, le vol semble difficile (Blatrix & Marty, communication personnelle). Cette expérience délicate à mettre en place et qui nécessite un élevage dans des mésocosmes avec un entretien régulier, pourrait être réitérée sur une durée plus longue afin de suivre l'émergence des reines ailées et de ne pas manquer la période d'essaimage au sein des colonies.

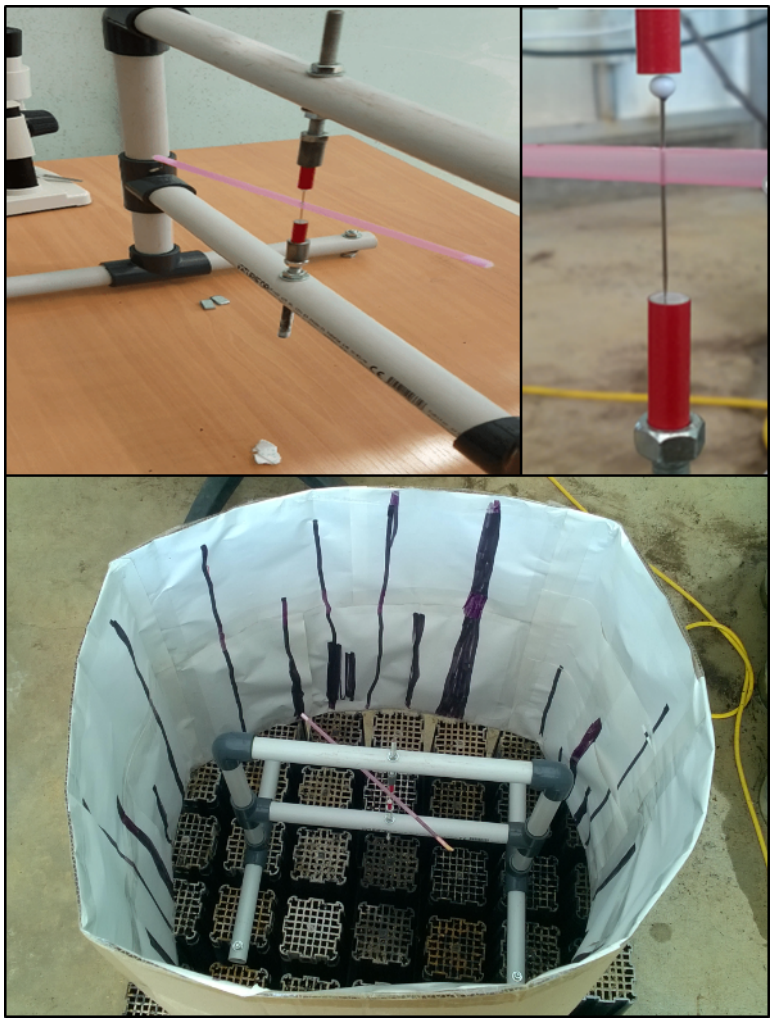


Figure 46 : Confection d'un moulin de vol adapté aux fourmis ailées par Blatrix & Marty. Le système est construit avec des tubes en PVC sur lesquels une paille en plastique est transpercée par une aiguille en son milieu où se trouve de part et d'autre deux aimants qui la maintiennent en équilibre. La fourmi pourra alors être accrochée à une extrémité de la paille. Un enclos cartonné avec des bandes noires a été disposé pour simuler un milieu en mouvement. La rotation de la paille sera réalisée par le vol de la fourmi ailée. Le comptage du nombre de tours pendant un temps donné peut se faire à l'aide d'une caméra fixe. Photos : Cyril Marty.

Dispersion par l'homme

La fragmentation des habitats engendrée par l'urbanisation entraîne souvent une diminution de la connectivité des paysages pour de nombreux organismes qui ont du mal à se déplacer et se disperser (McKinney, 2006). Cependant, les échanges de biens et le flux de personnes entre les pays, entre autres, à travers le tourisme et le commerce, favorisent le déplacement à longues distances de diverses espèces et leur permettent de dépasser les barrières

biogéographiques (Gippet et al., 2017 ; Marshall & Shortle, 2005). La dispersion par l'homme peut aussi se faire à petite échelle spatiale, on parle de dispersion à courte distance (human mediated short range dispersal) qui permet à certaines espèces de dépasser cette fragmentation (Gippet et al., 2017).

Dans le chapitre 2, nous avons montré que le paysage urbain semblait jouer un rôle dans la dispersion de *T. darioi* à travers les activités humaines notamment par le transport de terre lors d'aménagements urbains, de chantiers, d'entretien de routes ou de transports de plantes (jardineries, plantations dans des espaces verts), leur procurant ainsi un potentiel invasif très élevé (Lenoir & Galkowski, 2018 ; Ugelvig et al., 2008). En effet, les échanges commerciaux de marchandises et notamment de plantes et d'arbustes (comme les oliviers, les cyprès, …) se sont accélérés avec la mondialisation mais ils sont également très anciens entre les pays du pourtour du bassin méditerranéen constituant par ce fait des formes de corridors pour diverses espèces (Bertelsmeier et al., 2017 ; Lefeuvre, 2013 ; Schifani, 2019). Les insectes peuvent parfois être introduits de manière intentionnelle, pour servir dans la lutte biologique ou en tant que nouveaux animaux de compagnie, qui peuvent ensuite s'évader ou être relâchés dans la nature (Figure 47) (Gippet et al., 2019 ; Kumschick et al., 2016). Les fourmis sont parmi les espèces introduites les plus répandues (Tsutsui & Suarez, 2003). En effet, ces petits invertébrés sont facilement dissimulables et transportables, c'est le cas par exemple des fourmis *Linepithema humile*, *Lasius neglectus*, *Solenopsis invicta*, ou encore de *Tetramorium immigrans,* dont l'introduction est le plus souvent liée aux transferts de terre et de plantes lors de constructions, de chantiers ou d'aménagement d'espaces paysagers (Cordonnier et al., 2020 ; Heterick et al., 2013 ; King et al., 2009 ; McKinney, 2006 ; Ugelvig et al., 2008).

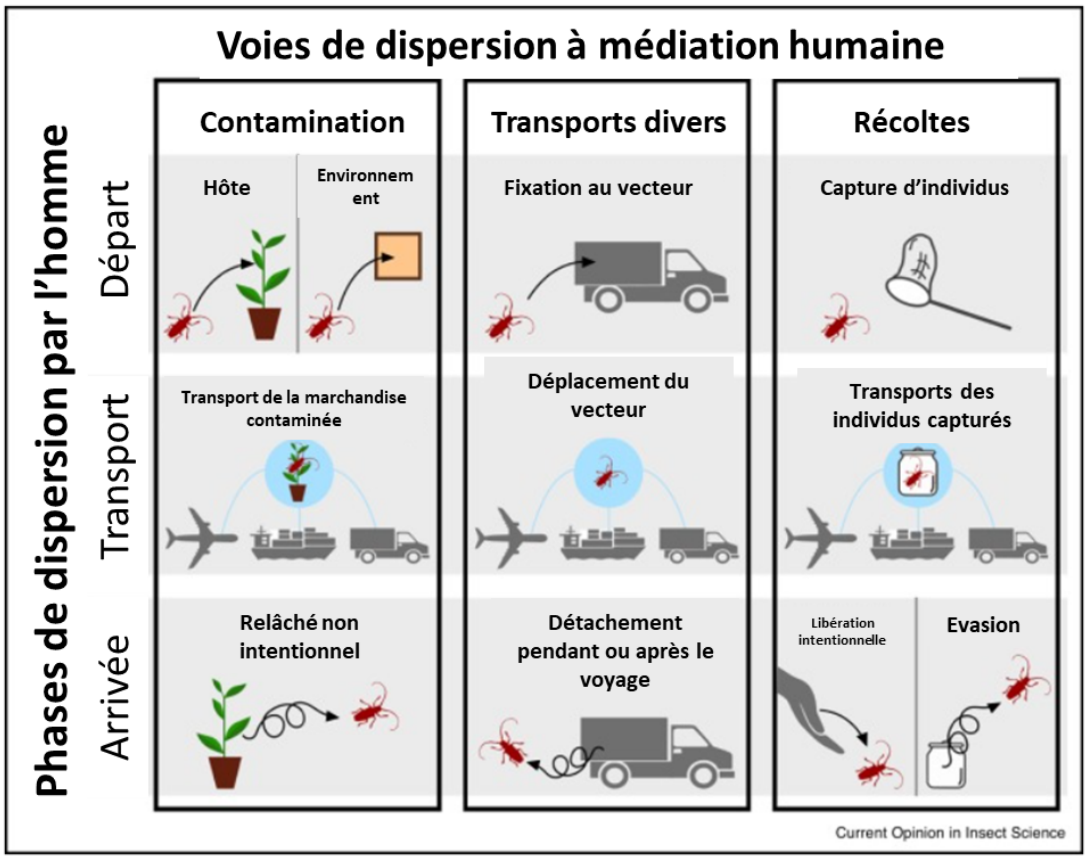


Figure 47 : Schéma représentant les trois phases de dispersion par l'homme ; le départ, le transport et l'arrivée avec les différentes possibilités d'invasion. Les deux premières voies, contamination et transports divers, sont accidentelles alors que la voie de récolte est intentionnelle (modifié de Gippet et al., 2019).

Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes de dispersion par l'homme est nécessaire pour comprendre l'étendue de certaines espèces et prédire les futures invasions (Cope et al., 2019 ; Gippet et al., 2019). Dans cette perspective, nous avons amorcé une pré-étude, en réalisant une liste de pépinières ou jardineries à prospecter situées à proximité de Montpellier. Cette analyse aurait consisté à échantillonner un ensemble de serres, pépinières ou jardineries pour cibler les potentielles voies de dispersion des fourmis et les plantes associées. Une première enquête a cependant été réalisée dans la serre municipale de Grammont, qui produit l'essentiel des plantes et sous arbrisseaux adaptés à la région dont la culture est essentiellement biologique, pour l'aménagement des espaces verts de la ville de Montpellier. Elle produit également son compost issu des déchets végétaux de la ville qui est ensuite répandu au niveau des espaces verts (M. Gauffier, chef de culture aux serres, Comm. Pers.). Cette prospection réalisée sur l'ensemble de la serre a montré que la fourmi d'Argentine y était majoritairement présente. D'autres pépinières fournissent également la ville en plantes et restent à visiter afin de voir si *T. darioi* y est présente et quelles espèces de plantes sont colonisées. Face à la complexité et l'ampleur des investigations auprès de nombreux pépiniéristes locaux, parfois même situés à l'étranger, l'enquête n'a pu être menée à terme. On peut noter également que le littoral de la zone d'étude (où *T. darioi* est observée) a bénéficié de programmes de restauration dunaire par

des transferts de terre et de plantations afin de limiter l'érosion des plages (Ley de la Vega et al., 2012).

Ces voies d'invasion, par le transfert de terre et plantes, sont encore peu documentées alors que des impacts considérables sont observés, avec des exemples dévastateurs, par d'autres organismes invasifs, comme avec la bactérie *Xylella fastidiosa* responsable de maladies potentiellement mortelles chez les plantes (Landa et al., 2020).

Par ailleurs, une étude publiée récemment en 2022 a montré que les espèces *T. magnum* et *T. darioi* ont été retrouvées fréquemment dans des végétaux en pots originaires de méditerranée, dont des oliviers séculaires (*Olea europaea*) dans des pépinières au niveau du massif armoricain, dans le nord-ouest de la France (Figure 48, Gouraud & Kaufmann, 2022). Cette étude confirme le résultat que nous avons mis en avant dans le chapitre 2 suggérant que les fourmis *T. darioi* se disperseraient à travers les déplacements par l'homme dont le transport de plantes. De plus, aujourd'hui les villes comme Montpellier sont dans une optique de végétalisation de l'espace urbain avec l'aménagement d'espaces verts ce qui pourrait favoriser cette espèce qui ne tolère pas l'urbanisation au-delà de 75% (Chapitre 1, Centanni et al., 2022 ; INSEE & SOeS, 2009).



Figure 48 : Photo illustrant un exemple d'introduction des fourmis du complexe *T. nigerrimum* dans des pots d'oliviers vendus dans des pépinières à Saint-Lyphard dans l'ouest de la France (Gouraud & Kaufmann, 2022 ; Photo : Gouraud, 2020).

Ainsi, un approfondissement des connaissances de l'ensemble de ces éléments semble essentiel à mener dans l'établissement d'une stratégie préventive de suivi, de contrôle et d'endiguement de la propagation des *Tapinoma* invasives. En effet, la stratégie de contrôle la plus efficace est d'empêcher les espèces invasives d'envahir de nouvelles zones (Mack et al., 2000 ; Sax et al., 2005). Le principe de précaution consisterait donc à réaliser une détection précoce, ainsi qu'un contrôle plus efficace des échanges commerciaux

de végétaux (Gouraud & Kaufmann, 2022) et des transferts de terre destinés aux aménagements divers et aux chantiers de constructions.

Axe 3 : Impact des espèces invasives

De potentiels impacts négatifs

Il existe de réels impacts négatifs écologiques, sociaux-économiques ou sanitaires générés par les espèces invasives qui sont appuyés par de nombreuses études et qui pourraient s'accroitre dans les années à venir (Bertelsmeier, 2013 ; Bradshaw et al., 2016 ; Lefeuvre, 2013). Parmi les impacts négatifs, on peut citer l'altération du fonctionnement des écosystèmes, la réduction de la taille des populations et les extinctions engendrées (Pyšek et al., 2017). Actuellement, 58% des extinctions d'espèces sont causées par les espèces invasives (Bellard et al., 2016). Mesurer les impacts des espèces invasives est donc important et déterminera la considération de l'espèce dans l'avenir (Hulme et al., 2013).

Il existe des cas où l'invasion est au début, insoupçonnée et devient avec le temps de plus en plus visible. C'est le cas de la Perruche à collier, *Psittacula krameri,* introduite au Royaume-Uni dans les années 1960, dont la croissance a augmenté lentement pendant 15-20 ans, puis a connu une explosion démographique et comptait, en 2007, plus de 20 000 individus (Figure 49). Elle est devenue une menace pour les espèces locales, est également porteuse de certaines maladies pouvant affecter les autres espèces d'oiseaux et représente une nuisance pour les agriculteurs (Butler, 2003 ; Butler, 2005). En France, un développement rapide est observé, même si le nombre de perruches n'est pas alarmant, des méthodes de prévention sont donc mises en place afin d'anticiper les potentiels dommages qui deviennent difficilement gérables quand l'espèce est trop abondante (Clergeau et al., 2009 ; Croquet & Rozzo, 2018).

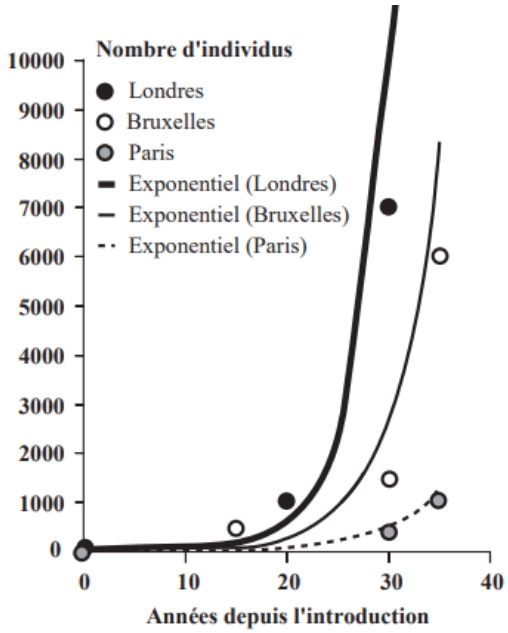


Figure 49 : Graphique représentant la croissance exponentielle des Perruches à collier à Londres, Bruxelles et Paris.

Les impacts ne sont en effet pas toujours flagrants. *Tapinoma darioi* n'a, à ce jour, pas montré d'effet sur la myrmécofaune dans les espaces verts urbains à Montpellier (Chapitre 3). Cependant, Gouraud & Kaufmann (2022) ont suggéré que les *Tapinoma* invasives introduites sur la côte ouest française au niveau des massifs dunaires de Vendée pouvaient potentiellement affecter des colonies vulnérables de *Formica selysi* ou d'autres espèces rares comme le papillon *Plebejus argus plouharnelensis*. Par ailleurs, des impacts ont été constatés concernant *T. magnum* sur la myrmécofaune et également sur les vignobles ou cultures d'agrumes en Corse (Figure 50) (Lenoir & Galkowski, 2018). Effectivement, les espèces du complexe *T. nigerrimum* entretiennent une relation de mutualisme avec des pucerons en les protégeant des prédateurs comme les coccinelles en échange de leurs miellats sucrés (Figure 50B). La survie de ces pucerons est nuisible à travers les dégâts qu'ils causent sur les cultures. Actuellement, peu d'études sont recensées sur ce sujet. Des dommages ont été constatés uniquement par *T. magnum,* mais étant donné que *T. darioi* réalise le même type d'interaction avec les pucerons, il serait intéressant de suivre cette problématique plus précisément avec cette espèce et en particulier dans le sud de la France qui est riche en vignobles, vergers et maraîchages (DRAFF, 2014a ; DRAFF, 2014b). *Tapinoma darioi* est majoritairement observée en milieux urbains et peu dans les zones à usage agricole. Cependant, d'après quelques témoignages de particuliers, des dégâts sont remarqués, notamment dans une ferme pédagogique à Saint Jean de Vedas, commune proche de Montpellier où *T. darioi* semble empêcher l'utilisation des potagers ouverts au public par ses morsures (bénignes) et par sa prolifération au niveau du compost mais aussi en abimant fruits et légumes (Lenoir, 2021, Comm. Pers.).

On peut également évoquer les supercolonnies de *T. darioi* qui ont été observées le long des côtes, au niveau des dunes entre Carnon et la Grande-Motte à proximité de la plage du petit Travers à Mauguio. Leur présence de plus en plus remarquée sur la plage pourrait avoir une répercussion négative sur l'attrait touristique de la zone envahie.

Ainsi, pour les espèces invasives, la prévention et le principe de précaution sont souvent utilisés (Clergeau et al., 2009). C'est pourquoi ce dernier pourrait être mis en place avant d'atteindre des nuisances difficiles à gérer avec des populations devenues trop proliférantes (Clergeau et al., 2009).

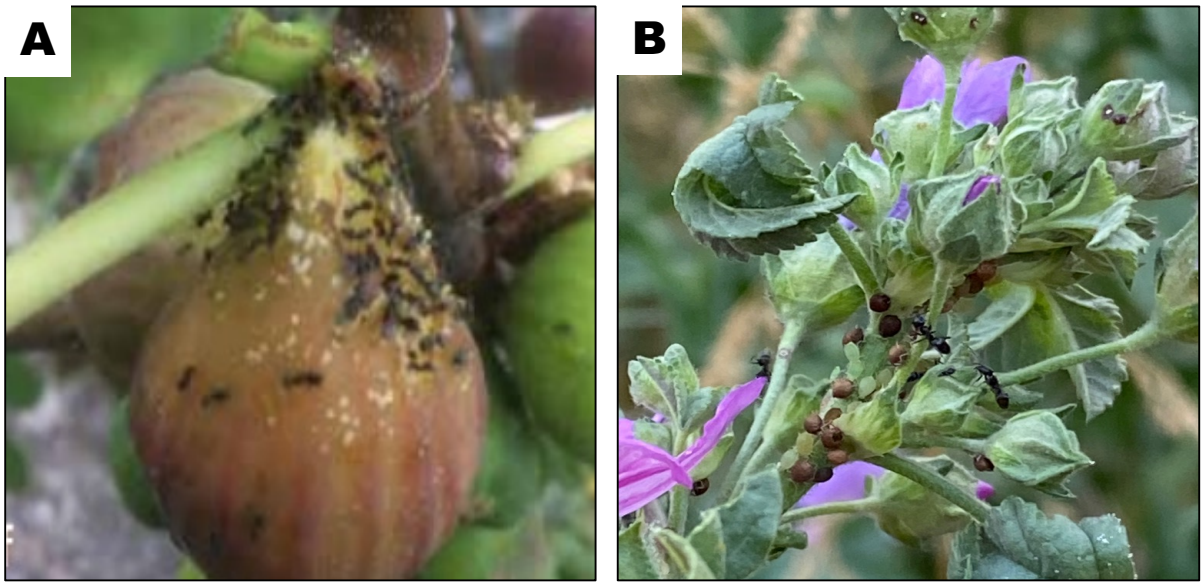


Figure 50 : A) Ouvrières de *Tapinoma* consommant une figue (Freitag & Cherix, 2019). B) Ouvrières de *Tapinoma darioi* en interaction avec des pucerons verts sur une mauve commune, *Malva sylvestris* de Montpellier (Parc George Charpak), photo : Julia Centanni.

De nombreux moyens sont utilisés pour prévenir, gérer et lutter contre les fourmis invasives, ces moyens sont majoritairement chimiques (insecticides, appâts toxiques) consistant à éradiquer des populations ou à limiter leur dispersion (Hoffmann et al., 2010). Les appâts toxiques sont par exemple utilisés sur la fourmi d'Argentine (Blight, 2010). Ce procédé consiste à disperser un poison avec un composé, actif seulement au bout de quelques jours après ingestion, à l'intérieur de la colonie, afin d'infecter la reine et le couvain par trophallaxie, c'est-à-dire par échange de nourriture régurgitée (Silverman & Brightwell, 2008). Mais les moyens chimiques ne sont pas sans impact sur l'environnement, la biodiversité et la santé (Cherin et al., 2012 ; Juc, 2007) et présentent également un risque de développement de résistances à ces produits par les espèces (Kerr, 1977). D'autant plus que les insecticides sont non sélectifs et peuvent toucher d'autres espèces (Blight, 2010). C'est pourquoi des méthodes alternatives, comme la lutte biologique, sont intéressantes à développer. Ce processus écologique consiste à diminuer l'impact des bioagresseurs à l'aide d'autres organismes pour les rendre moins abondants et diminuer leurs effets (Eilenberg et al., 2001). Cependant ces pratiques présentent aussi des risques, par exemple le prédateur utilisé peut changer de cible, c'est ce qui s'est produit avec la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* (Martin et al., 2005). Les organismes utilisés sont en général des insectes mais des petits organismes peuvent également être adoptés comme les nématodes qui peuvent parasiter l'espèce en question (Van Lenteren, 2012). C'est le cas des nématodes entomopathogènes, petits vers microscopiques, blancs à transparents, qui ont permis de réguler des populations d'insectes ravageurs de cultures (Laumond et al., 1979 ; Poinar, 1979). Par exemple, les nématodes se sont avérés efficaces pour lutter contre une espèce de charançons dans les plantes en pot, les framboises et les raisins en pépinière (Bedding &

Miller, 1981). Des études ont montré que les nématodes avaient le potentiel de contrôler notamment la fourmi de feu, *Solenopsis invicta* (Juvenaz et al., 1990).

Des études sont en cours sur la lutte biologique contre la fourmi *Tapinoma magnum* au vu des dégâts engendrés en Corse, avec l'évaluation en laboratoire de l'impact de nématodes entomopathogènes sur cette espèce (travaux réalisés par Benoit Cailleret, Bastien Quaglietti et leur étudiant Zibo Ousseini Halimatou, Comm. Pers.). Ainsi, Benoit Cailleret, Bastien Quaglietti et leur étudiant Zibo Ousseini Halimatou, ont testé plusieurs souches de nématodes et ont montré que leur utilisation pour contrôler *T. magnum* semble envisageable dans les vergers d'agrumes mais nécessite encore un protocole précis pour une application sur le terrain. Cette utilisation pourrait s'étendre à *T. darioi* si de plus importants impacts étaient observés dans l'avenir. En effet, les impacts potentiels sur la biodiversité ne doivent pas être négligés et sont parfois sous-estimés au début car ils peuvent parfois mettre du temps avant de s'amplifier (Downey & Richardson, 2016).

Mais aussi des effets positifs observées : espèces facilitatrices

Malgré l'observation de nombreux effets négatifs, bien documentés, engendrés par les espèces invasives, il s'avère aussi que certains aspects positifs peuvent en découler (Lévêque et al., 2010). On parle d'interaction de facilitation, lorsqu'une relation entre deux espèces entraîne une augmentation de la densité ou de la biomasse d'au moins une des espèces (Rodriguez, 2006). Très peu d'études ont abordé ces effets positifs possibles, qui sont pourtant observés chez des espèces invasives sur des espèces locales comme la modification ou la création d'habitat, des effets indirects en cascade, par la fourniture des ressources limitantes aux niveaux trophiques supérieurs, ou par la réduction d'un prédateur dominant (Rodriguez, 2006). Par exemple, Thomsen et al. (2010) ont montré que les algues invasives, malgré leurs effets négatifs sur certains taxons d'invertébrés, pouvaient avoir des effets positifs sur la macrofaune estuarienne par la formation d'habitats. La moule zébrée, *Dreissena polymorpha,* crée aussi des zones d'habitat nouvelles qui servent aux espèces indigènes (Bially & MacIsaac, 2000). Les impacts d'une espèce invasive dépendent également de la zone étudiée et ceux-ci peuvent évoluer (Lefeuvre, 2013). Certaines espèces peuvent proliférer et diminuer drastiquement après plusieurs années, c'est le cas de l'algue *Caulerpa taxifolia* qui a envahi les fonds marins en méditerranée et qui est aujourd'hui en régression (Barbault, 2010).

Par exemple dans les milieux perturbés, les quelques espèces qui y sont favorables vont coloniser des niches généralement vides et permettre ainsi de rétablir des fonctions écosystémiques qui seraient absentes ou détériorées sans leur présence (Bulleri et al., 2006 ; Fischer et al., 2009 ; Rodriguez, 2006). Il y a formation de néo-écosystèmes avec des conditions environnementales modifiées, incluant la présence d'espèces invasives qui peuvent faciliter le retour d'autres espèces (Kowarik, 2011 ; Morse et al., 2014). Les parcs urbains représentent des néo-écosystèmes (Cruz et al., 2013). Par exemple, la fourmi

Sonelopsis invicta, qui engendre de nombreux effets négatifs, possède cependant des rôles positifs comme la dissémination de graines (Stuble et al., 2010). La fourmi d'Argentine, malgré ses impacts négatifs, est également favorable à la dispersion des graines d'une plante endémique, *Anchusa crispa* et réduit également la prédation de ces graines par les autres fourmis granivores (Blight, 2010). Les effets positifs sont souvent négligés et non étudiés ; pourtant des études montrent que les espèces invasives peuvent restructurer des écosystèmes dans les milieux dégradés en présentant une résistance aux changements globaux (Rodriguez, 2006 ; Tassin & Kull, 2015). Il est donc important de prendre aussi en compte les éventuels effets positifs des espèces invasives (Tassin & Kull, 2015).

Dans le cas de *Tapinoma darioi*, qui n'a pour le moment pas montré d'effet sur la myrmécofaune, son évolution reste cependant à surveiller également dans les milieux proches de la côte et dunaires où elle est aussi très observée (Centanni et al., 2022 ; Seifert et al., 2017) et ses potentiels effets positifs sont à étudier.

La connaissance de toutes les interactions avec les espèces invasives, y compris la facilitation, est donc également importante à étudier pour la gestion des écosystèmes.

L'unicolonialité et la faible diversité génétique des espèces invasives

Le succès des fourmis invasives est dû à leur unicolonialité qui est caractérisée par l'absence de comportement agressif entre colonies qui vont s'associer et former des réseaux de nids interconnectés (Holway & Suarez, 1999 ; Wilson, 1971). Cette absence de coûts énergétique dûe à l'agression intraspécifique, permet à ces espèces unicoloniales d'allouer leurs ressources à la compétition interspécifique, la croissance de la colonie ou encore la recherche de nourriture (Holway et al., 1998). Par exemple *Solenopsis invicta*, aux États-Unis, présente un caractère unicolonial où l'on observe un mélange d'ouvrières de divers nids sans ou avec peu d'agression (Mirenda & Vinson, 1982). Cette unicolonialité a cependant l'inconvénient d'engendrer une diversité génétique faible comme c'est le cas pour la fourmi d'Argentine ou la fourmi de feu qui ont été introduites à partir de petites populations (Ross et al., 1993). L'unicolonialité permet aux fourmis invasives de prospérer à court terme mais peut limiter leur viabilité à long terme (Passera & Aron, 2005). Par exemple, en Europe, la fourmi des jardins envahissante, *Lasius neglectus,* s'est rapidement répandue mais sa propagation est actuellement ralentie et sa population a diminué (Tartally et al., 2016) de même, en Australie, des populations de fourmi folle jaune, *Anoplolepis gracilipes,* ont faibli sans intervention humaine (Cooling & Hoffmann, 2015). Les supercolonies peuvent en effet parfois décliner. Ce phénomène est connu pour d'autres taxons, comme par exemple l'escargot envahissant *Achatina fulica* qui a connu une forte expansion puis un déclin rapide (Simberloff & Gibbons, 2004). Une faible diversité génétique peut diminuer la capacité de ces espèces à s'adapter aux nouvelles contraintes environnementales, engendrant entre autres une sensibilité plus forte aux agents pathogènes ou parasites ; on parle de goulot d'étranglement (« bottleneck ») (Tsutsui & Suarez, 2003).

Concernant *Tapinoma darioi*, il est probable que la zone d'étude située à Montpellier et ses alentours se trouve au niveau de l'aire d'origine de cette espèce où l'on observe une diversité de populations d'origines différentes, locales et potentiellement introduites, provenant d'Italie, d'Espagne et de la côte méditerranéenne française (Chapitre 2). De plus, la zone méditerranéenne est un carrefour propice aux échanges réguliers de plantes ou de terres pouvant transporter des *Tapinoma* favorisant ainsi des flux génétiques à courtes et longues distances (Chapitre 2). Ainsi, en fonction du nombre d'individus transportés des goulots d'étranglement pourraient être amenés à apparaitre en raison de l'effet Wahlund (Zhivotovsky, 2015).

Il reste de nombreux aspects à découvrir sur le complexe *Tapinoma nigerrimum*, nous évoquerons ensuite quelques perspectives d'étude.

3. Perspectives & Pistes de recherche

3.1. Aire d'origine des espèces invasives du complexe

Actuellement, seule l'étude de Seifert répertorie à échelle européenne les espèces invasives du complexe avec un échantillonnage réalisé à partir de données opportunistes (Seifert et al., 2017). Nous savons à ce jour qu'elles ont une origine méditerranéenne mais l'origine plus précise de chaque espèce reste à déterminer (Seifert et al., 2017). Notre échantillonnage ainsi que l'utilisation de microsatellites et d'analyses génétiques a révélé cependant que *Tapinoma darioi* possédait une grande population proche de la côte, observée nulle part ailleurs. Un échantillonnage à plus fine échelle et plus étendu sur le bassin méditerranéen et au niveau européen serait nécessaire pour étudier la distribution des espèces du complexe *T. nigerrimum*. Cette recherche permettrait d'avoir un aperçu plus précis de leurs zones d'origine et d'identifier les populations sources sans les manquer, comme cela a déjà été réalisé avec la fourmi de feu (Ascunce et al., 2011) ou avec le frelon asiatique (Arca et al., 2015).

3.2. Étude de la compétition, interaction entre fourmis

Une approche complémentaire au chapitre 3 consisterait à réaliser des analyses comportementales pour mieux comprendre les interactions entre les espèces.

Des tests directs d'agression (Lenoir & Galkowski, 2018) seraient intéressants à mener entre *Tapinoma darioi* et les autres espèces présentes à Montpellier pour mieux comprendre leur relation. Des pré-expérimentations avaient été initiées en ce sens, où des individus d'espèces différentes notamment des *Messor barbarus* et des *Lasius niger* avaient été prélevés sur le terrain et mis en contact avec *T. darioi*. Les premières observations ont montré un comportement d'évitement entre *M. barbarus* et *T. darioi* et des comportements d'agressions avec morsures entre *L. niger* et *T. darioi*. Cependant ces premières observations ne peuvent être exploitées car ces tests nécessitent d'établir une acclimatation préalable des

individus et donc un élevage qui permettrait d'avoir un grand nombre de réplicats. De plus, cela demande une étude à plusieurs échelles : de l'individu à la colonie (test 1 contre 1, des groupes d'individus ou des colonies entières avec 300 à 500 ouvrières) (Blight, 2010).

Les expérimentations entre groupes d'ouvrières ou 1 contre 1 consistent à observer, après un temps d'acclimatation, les différents comportements adoptés par les individus après reconnaissance de l'étranger : l'ignorance, l'anténnation, l'évitement, les combats et les morsures, ainsi que les premières interactions et les issues des combats (mort, vivant ou blessé) (Ugelvig et al., 2008).

Les expérimentations entre colonies entières consisteraient à connecter les nids artificiels de deux espèces différentes à une aire de fourragement, elles apporteraient plus de précisions sur le processus de compétition. Mais cette manipulation nécessite aussi beaucoup plus de temps avec un suivi journalier sur plusieurs semaines pour observer les différentes issues (Bertelsmeier, 2013).

Les fourmis d'un même nid échangent des composés cuticulaires (hydrocarbures cuticulaires), qui déterminent la signature chimique de la colonie (Crozier & Dix, 1979). Ainsi, lorsque les individus se rencontrent et que l'odeur diffère les individus s'agressent ou fuient, à l'inverse si la signature chimique est similaire ils se reconnaissent et considèrent qu'ils appartiennent à la même colonie, c'est ainsi que les supercolonies arrivent à se former (Blight, 2010).

Parmi les principales espèces candidates à sélectionner pour ces tests face à *Tapinoma darioi*, se trouvent par exemple *Pheidole pallidula,* car elle est souvent présente avec *T. darioi* dans les espaces verts urbains Montpellierains*,* ou *Messor barbarus* car les deux espèces semblent se tolérer (Chapitre 3). *Lasius niger* pourrait également être étudiée car Gippet et al. (2022) ont montré qu'il y avait une coexistence avec *T. magnum.* De même, l'utilisation d'espèces qui coexistent peu avec *T. darioi* mais qui sont présentes dans les parcs urbains serait intéressante. Enfin, l'interaction avec *T. magnum* serait aussi pertinente à mesurer. Etant donné l'impact négatif déjà constaté de *T. magnum* sur les communautés locales de fourmis (Gippet et al., 2022), on pourrait s'attendre à une compétition spatiale et alimentaire avec *T. darioi*.

3.3. Étude du développement des espèces du complexe *Tapinoma nigerrimum* en fonction des types de sols

L'étude des conditions favorables au développement du complexe *Tapinoma nigerrimum* en fonction de différents types de sol et d'humidité serait très utile. Cette expérimentation viserait à comprendre l'influence des paramètres environnementaux qui différencient garrigue (sol argileux) et milieu littoral (sols sableux) en étudiant la structure des galeries

grâce à la microtomographie par rayons X. La microtomographie est une méthode non destructive qui consiste à étudier en 3D les variations de densités ce qui permet de visualiser les galeries construites par les insectes étudiés (Collaboration Renaud Lebrun à l'ISEM, Plateforme MRI Montpellier).

Notre hypothèse suggère que les sols sableux présents dans les villes du littoral seraient plus faciles à creuser, plus aérés que les sols de garrigue, très riches en argile et plus compacts. En conséquence, les populations de fourmis pourraient augmenter leur densité rapidement, conduisant à l'invasion dans des sols sableux (Figure 51). Un sol plus compact serait moins favorable à l'installation de la colonie.



Figure 51 : Nid de *Tapinoma darioi* dans un sol sableux humide à Montpellier. Photo : Julia Centanni.

Des pré-analyses ont été réalisées sur 15 mésocosmes (pots en plastique de 20 cm de diamètre) dans lesquels des colonies de *Tapinoma darioi* avaient été préalablement installées (le nombre de reines et d'ouvrières mises en place a été standardisé) avec différentes modalités croisées : texture (sable ou argile), humidité (sec ou humide) et nombre de reines (1 ou 4) (Figure 52). Ces 15 mésocosmes ont donc été scannés par

microtomographie (Collaboration Renaud Lebrun à l'ISEM, Plateforme MRI Montpellier). Le nombre de réplicats pour chaque modalité n'était pas assez important pour poursuivre l'analyse (en moyenne 2 réplicats par modalités). D'après les premières observations, des différences apparaissent au niveau de la structure des galeries entre milieux argileux et milieux sableux (Figure 52). Les galeries semblent plus importantes lorsque les conditions sont humides pour les deux types de sols. Les galeries sont plus nettes et plus nombreuses dans le sol sableux et forment des filaments contrairement aux milieux argileux où les filaments sont nettement moins visibles (Figure 52). Un renouvellement de l'expérimentation et un nombre plus important de réplicats est nécessaire pour réaliser des analyses statistiques et approfondir l'étude.

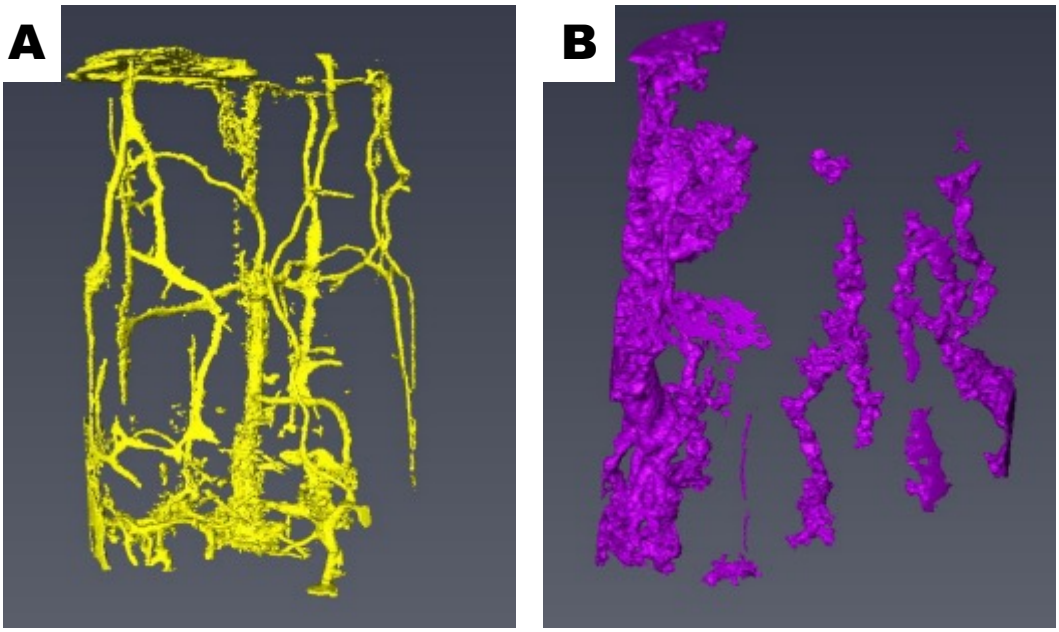


Figure 52 : Visualisation des galeries en 3D de *Tapinoma darioi* à l'aide de la microtomographie A) dans le milieu sableux et B) dans le milieu argileux.

Des mesures portant sur l'effet des paramètres abiotiques du sol sur les fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* pourraient être menées, comme l'exposition au soleil et la température du sol à proximité des nids avec des e-boutons. Parallèlement, des échantillons de sol au niveau des nids pourraient être prélevés et analysés pour en déterminer la composition comme la teneur en matière organique, les quantités de carbone organique et de nitrates, les éléments traces métalliques tels que le cuivre et le plomb, la texture et l'hygrométrie. Ces analyses sont cependant longues et nécessitent un certain investissement financier. On s'attend à observer des différences entre les nids les espèces du complexe, avec des températures à proximité plus élevées pour *T. darioi* car elle est présente dans les milieux urbains.

3.4. Étude de la tolérance thermique

L'exploration des caractéristiques des espèces du complexe est d'un intérêt primordial pour améliorer la compréhension de leur écologie. D'autant plus que l'évolution des températures induite par le changement climatique influencera nécessairement le comportement de l'ensemble des espèces, leur permettant de franchir des barrières thermiques qui généralement limitent beaucoup d'espèces (Cordonnier et al., 2020 ; Dukes & Mooney, 1999 ; Hellmann et al., 2008 ; Sala et al., 2000). Il est donc intéressant d'étudier la tolérance au stress comme la résistance aux températures extrêmes. Dekoninck et al. (2015) ont observé que des colonies de *Tapinoma magnum* avaient survécu à des périodes de gel présentant des températures variant entre -15°C et -6,6°C et que leur dernière activité était remarquée fin décembre avec des températures de 8°C en Allemagne. Aux Pays-Bas, *T. darioi* a également été observée fin décembre à des températures variant de -2 °C à 3 °C (Noordijk, 2016). Les fourmis, organismes ectothermes, ont une température qui dépend des échanges thermiques avec leur environnement. On pourrait donc imaginer que leur période d'activité puisse s'étendre avec le changement climatique. Il est attendu que les organismes ectothermes des milieux urbains soient plus tolérants au froid et à la chaleur que ceux vivants en milieux ruraux (McLean et al., 2015).

L'étude de la tolérance à la chaleur consiste à observer le temps nécessaire à la perte de mobilité, par exposition progressive à la chaleur, étant donné que le maximum thermique critique est de 44°C d'après l'étude menée par Angilletta et al. (2007) pour les fourmis coupeuses de feuilles *Atta sexdens rubropilosa*.

A l'inverse, la tolérance au froid consiste à observer le temps nécessaire à la récupération de la mobilité après une exposition à 0°C. L'expérimentation consiste cette fois-ci à placer les individus dans la glace pendant une vingtaine de minutes, à les positionner ensuite sur le dos à l'intérieur d'un cercle tracé sur une feuille de papier à température ambiante (25°C) et de mesurer le temps de reprise d'activité c'est-à-dire le temps nécessaire pour que les fourmis sortent du cercle (Angilletta et al., 2007).

Ces analyses pourraient être mises en place dans l'avenir car elles viendraient compléter nos connaissances sur ce complexe d'espèces et permettraient d'appréhender leur comportement face aux changements climatiques.

Conclusion

Pour conclure, nous avons mis en évidence un effet non linéaire du paysage urbain sur un complexe d'espèces avec des réponses contrastées et avec un effet de seuil délétère pour les deux espèces du complexe les plus présentes dans notre zone d'étude. La dispersion d'une espèce du complexe à travers les déplacements de l'homme a pu être suggérée. Enfin notre étude n'a pas révélé d'impacts de *Tapinoma darioi* sur la myrmécofaune dans les

espaces verts urbains. Dans les milieux perturbés et dans un contexte de changements globaux, certaines espèces plus adaptées comme les espèces invasives peuvent prendre le relais et assurer des fonctions nécessaires au rétablissement d'une nouvelle biodiversité engendrant la création d'un néo-écosystème (Hobbs et al., 2009 ; Pecl et al., 2017). Cependant les dégâts engendrés par ses espèces ne sont pas à négliger et il est important de prendre en compte de manière efficace les causes de leur prolifération et l'ensemble des conséquences négatives et positives qu'elles peuvent provoquer sur la biodiversité.

Références

Alberti M (2015) Eco-evolutionary dynamics in an urbanizing planet. Trends in Ecology & Evolution. 30:114±126. doi: 10.1016/j.tree.2014.11.007

Angilletta MJ, Wilson RS, Niehaus AC, et al (2007) Urban Physiology: City Ants Possess High Heat Tolerance. PLoS One 2:e258. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000258

Antrop M (2004) Landscape change and the urbanization process in Europe. Landscape and urban planning, 67(1-4), 9-26.

Agosti D, Majer JD, Alonso LE, Schultz TR (2000) Ants: Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

Arca M, Mougel F, Guillemaud T, Dupas S, Rome Q, et al (2015) Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, in Europe. Biological Invasions, Springer Verlag, 17 (8), pp.2357-2371. ff10.1007/s10530-015-0880-9ff. ffhal-02370176

Arnan X, Cerdá X, Retana J (2012) Distinctive life traits and distribution along environmental gradients of dominant and subordinate Mediterranean ant species. Oecologia, 170, 489–500.

Arnan X, Cerdá X, Retana J (2014) Ant functional responses along environmental gradients. Journal of Animal Ecology 83:1398–1408. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12227

Ascunce MS, Yang CC, Oakey J, Calcaterra L, Wu W J, Shih C J., ..., Shoemaker D (2011) Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*. Science, 331(6020), 1066- 1068.

Auffret AG, Berg J, Cousins SAO (2014) The geography of human-mediated dispersal. Diversity and Distributions, 20, 1450±1456

Barbault R (2010) Les invasions biologiques ; une question de natures et de sociétés, Quae.

Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mersey B, Ferrer EA (2011) Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? Nature, 471, 51–57. doi:10.1038/nature09678

Baugnée J-Y & Godeau J-F (2000) Signalement de *Monomorium monomorium* Bolton et de quelques autres fourmis à Belle-Ile-en-Mer, en Bretagne (Hymenoptera, Formicidae). Bulletin de la Société Entomologique de France 105:205–208. https://doi.org/10.3406/BSEF.2000.16660

Bedding RA & Miller LA (1981) Use of a nematode, *Heterorhabditis heliothidis*, to control black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in potted plants. Annals of Applied Biology, 99, 211–216.

Bellard C, Cassey P, Blackburn TM (2016) Alien species as a driver of recent extinctions. Biology Letters 12, 20150623.

Bertelsmeier C (2013) Invasion biology of ants under climate change. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI. English. ⟨NNT : 2013PA112358⟩. ⟨tel-01124200⟩

Bertelsmeier C & Courchamp F (2014) Future ant invasions in France. Environmental Conservation, 41, 217±228.

Bertelsmeier C, Blight O, Courchamp F (2016) Invasions of ants (Hymenoptera: Formicidae) in light of global climate change. Myrmecological News, 22, 25–42. Retrieved from http://max2.ese.upsud.

Bertelsmeier C, Ollier S, Liebhold A, Keller L (2017) Recent human history governs global ant invasion dynamics. Nature Ecology & Evolution. 1:0184

Bially A & MacIsaac HJ (2000) Fouling mussels (*Dreissena spp*.) colonize soft sediments in Lake Erie and facilitate benthic invertebrates. Freshwater Biology 43(1), 85–97

Bierwagen BG (2007) Connectivity in urbanizing landscapes: the importance of habitat configuration, urban area size, and dispersal. Urban Ecosystems, 10: 29-42.Blair RB (1996) Land use and avian species diversity along an urban gradient. Ecological Applications, 6:506.

Blatrix R, Galkowski C, Lebas C, Wegnez P (2013) Fourmis de France. Guide Delachaux

Blight (2010) Ampleur et conséquences écologiques de l'envahissement du littoral Corse par la fourmi d'Argentine (*Linepithema humile*, Mayr). Thèse de doctorat.

Blight O, Orgeas J, Torre F, Provost E (2014) Competitive dominance in the organisation of Mediterranean ant communities. Ecological Entomology 39:595–602. https://doi.org/10.1111/EEN.12137

Blight O, Josens R, Bertelsmeier C, et al (2017) Differences in behavioural traits among native and introduced colonies of an invasive ant. Biological Invasions, 19:1389–1398. doi: 10.1007/s10530-016-1353-5

Blouin M, Hodson ME, Delgado EA, et al (2013) A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. European Journal of Soil Science 64:161–182. https://doi.org/10.1111/EJSS.12025

Blumenfeld AJ, Eyer P, Helms AM, Buczkowski G, Vargo EL (2021) Consistent signatures of urban adaptation in a native, urban invader ant *Tapinoma sessile*. Molecular Ecology mec.16188.

Bohlen PJ (2006) Biological invasions: Linking the aboveground and belowground consequences. Applied Soil Ecology 32:1–5. https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2005.10.001

Bøhn T, Amundsen PA, Sparrow A (2008) Competitive exclusion after invasion?. Biological Invasions, 10, 359–368. https://doi.org/10.1007/s10530-007-9135-8

Bolton B (2016) An online catalog of the ants of the world. (http://antcant.org).

Bonil C, Caruso E, Cereda E, et al (1988) Particulate matter elemental characterization in urban areas: Pollution and source identification. Journal of Aerosol Science 19:1271–1274. https://doi.org/10.1016/0021-8502(88)90152-8

Borcard D, Gillet F, Legendre P (2018) Introduction. In: Numerical Ecology with R. Use R!. Springer, Cham. pp 1–9 https://doi.org/10.1007/978-3-319-71404-2_1

Bračko G (2019) Two invasive ant species, *Lasius neglectus* Van Loon et al., 1990 and *Tapinoma magnum* Mayr, 1861 (Hymenoptera: Formicidae), living in close proximity in coastal Slovenia Natura Sloveniae 21: 25-28.

Bradshaw CJA, Leroy B, Bellard C, et al (2016) Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. Nature 7:12986. doi: 10.1038/ncomms12986

Breuste J, Niemelä J, Snep RP (2008) Applying landscape ecological principles in urban environments. Landscape Ecology, 23(10), 1139-1142.

Bristowe WS (1939) The comity of spiders. Adlard and Son London.

Brusa A & Holzapfel C (2017) Population structure of *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae): The role of land-use history and management. The Journal of the Torrey Botanical Society 145, 55–68.

Buczkowski G & Bennett G (2008) Seasonal polydomy in a polygynous supercolony of the odorous house ant, *Tapinoma sessile*. Ecological Entomology 33:780–788. https://doi.org/10.1111/J.1365-2311.2008.01034.X

Buczkowski G & Richmond DS (2012) The Effect of Urbanization on Ant Abundance and Diversity: A Temporal Examination of Factors Affecting Biodiversity. PLoS One 7:e41729. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0041729

Bulleri F, Airoldi L, Branca GM, Abbiati M (2006) Positive effects of the introduced green alga, *Codium fragile* ssp. tomentosoides, on recruitment and survival of mussels. Marine Biology 148:1213–1220. doi: 10.1007/s00227-005-0181-4

Butler CJ (2003) Population Biology of the Introduced Rose-Ringed Parakeet *Psittacula krameri* in the UK. PhD thesis, University of Oxford. https://www.researchgate.net/publication/35702506_Population_Biology_of_the_Introduced_Rose-Ringed_Parakeet_Psittacula_krameri_in_the_UK.

Butler CJ (2005) Feral Parrots in the Continental United States and United Kingdom: Past, Present and Future. Journal of Avian Medicine and Surgery, 19 : 142-149.

Cadenasso ML, Pickett STA, Schwarz K (2007) Spatial heterogeneity in urban ecosystems: Reconceptualizing land cover and a framework for classification. Frontiers in Ecology and the Environment 5:80–88

Cadotte MW, Yasui SLE., Livingstone S, MacIvor JS (2017) Are urban systems beneficial, detrimental, or indifferent for biological invasion? Biological Invasions, 19: 3489-3503.

Cameron EK et al (2018) Global gaps in soil biodiversity data. Nature Ecology & Evolution, 2: 1042–1043.

Carlton JT (1996) Biological Invasions and Cryptogenic Species. Ecology, 77, no. 6 1653–55. https://doi.org/10.2307/2265767.

Caula S, Hvenegaard GT, Marty P (2009) The influence of bird information, attitudes, and demographics on public preferences toward urban green spaces: The case of Montpellier, France. Urban For Urban Green 8:117–128. https://doi.org/10.1016/j.ufug.2008.12.004

Centanni J, Kaufmann B, Blatrix R, Blight O, Dumet A, Jay-Robert P, Vergnes A (2022) High resolution mapping in Southern France reveals distributions of supercolonial and monodomous species in the *Tapinoma nigerrimum* complex (Hymenoptera: Formicidae) are related to sensitivity to urbanization. Myrmecological News.

Cerdá X, Retana J, Bosch J, Alsina A (1989) Exploitation of food resources by the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hym., Formicidae). Acta Oecologica, 10(4), 419-429.

Chambres L (2017) Urbanisation et santé : l'importance de la biodiversité. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01566220

Chapin S, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor R, Vitousek PM, Reynolds HL, Hooper Lavorel DU S, Sala OE, Hobbie SE, Mack MC, Días S (2000) Consequences of changing biodiversity. Nature, 405: 234-242.

Cherin P, Voronska E, Fraoucene N, De Jaeger C (2012) Toxicité aiguë des pesticides chez l'homme. Médecine & Longévité, 4, 68–74.

Chopard (1921) La fourmi d'Argentine dans le midi de la France. antbase.org

Christian CE (2001) Consequences of a biological invasion reveal the importance of mutualism for plant communities. Nature 413:635–639

Clémencet J, Viginier B, Doums C (2005) Hierarchical analysis of population genetic structure in the monogynous ant Cataglyphis cursor using microsatellite and mitochondrial DNA markers. Molecular Ecology, 14(12), 3735–3744. https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2005.02706.X

Clergeau P (2007) Une écologie du paysage urbain. Edition Apogée, Rennes, 144 pp.

Clergeau P, Vergnes A, Delanoue R (2009) La perruche à collier *Psittacula krameri* introduite en Ile-de-France : distribution et régime alimentaire Société d'Études Ornithologiques de France S E O F

Climate-data.org (2021) « Montpellier Climat (France) ».

Collins JP, Kinzig A, Grimm NB, Fagan WF, Hope D, Wu J, Borer WT (2000) A new urban ecology. American Scientist, 88: 416-425.Colyn M, Prunier JG, Legendre X, et al (2015) La génétique du paysage : origine et flux de dispersion des populations de cerf dans la Région Centre. Faune Sauvage, 307:24–31

Cooling M & Hoffmann BD (2015) Here today, gone tomorrow: declines and local extinctions of invasive ant populations in the absence of intervention. Biological Invasions 17:3351–3357. doi:10.1007/s10530-015-0963-7

Cope RC, Ross JV, Wittmann TA, Watts MJ, Cassey P (2019) Predicting the risk of biological invasions using environmental similarity and transport network connectedness Risk Anal, 39 pp. 35-53

Cordonnier M, Gibert C, Bellec A, et al (2019) Multi-scale impacts of urbanization on species distribution within the genus *Tetramorium*. Landscape Ecology 34:1937–1948. https://doi.org/10.1007/s10980-019-00842-7

Cordonnier M, Blight O, Angulo E, Courchamp F (2020) The native ant *Lasius niger* can limit the access to resources of the invasive argentine ant. Animals 10:1–17. 450 https://doi.org/10.3390/ani10122451

Costa C (2005) Atlas des espèces invasives présentes sur le périmètre du Parc naturel régional de Camargue, PNR de Camargue, 220p.

Crawley MJ (2009) The R Book. Wiley-Blackwell, Chicago.
Croquet V & Rozzo C (2018) Vers une stratégie pour contrôler les psittacidés exotiques en Provence-Alpes-Côte d'Azur. Lutte et gestion

Crozier RH & Dix MW (1979) Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. Behavioral Ecology and Sociobiology 4:217-224.

Cruz JC, Ramos JA, Silva LP da, Tenreiro PQ, Heleno RH (2013) Seed dispersal networks in an urban novel ecosystem. European Journal of Forest Research 132, 887–897.

Cushman SA & Mcgarigal K (2002) Hierarchical, Multi-scale decomposition of species-environment relationships

David G (2014) Étude des capacités de dispersion de *Monochamus galloprovincialis* vecteur du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*. Thèse de Doctorat. Bordeaux.

Davis MA & Thompson K (2001) «Invasion Terminology : Should Ecologists Define Their Terms Differently Than Others ? No, Not If We Want To Be of Any Help ! », Bulletin of the Ecological Society of America 82 : 206. — 2002, « Newcomers “Invade” the Field of Invasion Ecology: Question the Field’s Future », Bulletin of the Ecological Society of America 83 : 196-197.

Davis ES, Murray TE, Fitzpatrick Ú, et al (2010) Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floralis*. Molecular Ecology 19:4922–4935. https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2010.04868.X

Deichsel R (2006) Species change in an urban setting—ground and rove beetles (Coleoptera: Carabidae and Staphylinidae) in Berlin. Urban Ecosystems 9**,** 161–178. https://doi.org/10.1007/s11252-006-8588-3

Dekoninck W, Parmentier T, Seifert B (2015) First records of a supercolonial species of the *Tapinoma nigerrimum* complex in Belgium (Hymenoptera: Formicidae). Bulletin de la Société royale belge d'Entomologie / Bulletin van de Koninklijke Belgische Vereniging voor Entomologie 151 : 206-209.

Detrain C (1990) Field study on foraging by the polymorphic ant species, *Pheidole pallidula*. Insectes Sociaux 37, 315–332. https://doi.org/10.1007/BF02225995

Detrain C, Tasse O, Versaen M, Pasteels JM (2000) A field assessment of optimal foraging in ants: trail patterns and seed retrieval by the European harvester ant *Messor barbarus*. Insectes Sociaux. 471 47:56–62. https://doi.org/10.1007/S000400050009

D’Eustacchio D, Centorame M, Fanfani A, Senczuk G, Jimenez-Aleman G H, Vasco-Vidal A, Méndez Y, Ehrlich A, Wessjohann L, Francioso A (2019) Iridoids and volatile pheromones

of *Tapinoma darioi* ants: chemical differences to the closely related species *Tapinoma magnum*. Chemoecology, 29(2), 51-60.

di Castri F (1989) History of biological invasions with emphasis on the Old World. Pages 1–30 in J. Drake, F. di Castri, R. Groves, F. Kruger, H. A. Mooney, M. Rejmanek, and M. Williamson, editors. Biological invasions: a global perspective. Wiley, New York, New York, USA.

Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJB, Collen B (2014) Defaunation in the Antrhopocene. Science 401. 401–406

Dousset B, Gourmelon F, Laaidi K, Zeghnoun A, Giraudet E, Bretin P, Mauri E, Vandentorren S (2011) Satellite monitoring of summer heat waves in the Paris metropolitan area. International Journal of Climatology 31: 313±323. https://rmets.onlinelibrary.wiley.com/journal/10970088

Downey PO & Richardson DM (2016) Alien plant invasions and native plant extinctions: a six-threshold framework. AoB Plants 8:plw047. https://doi.org/10.1093/AOBPLA/PLW04

DRAFF (2014a) Languedoc-Roussillon DRAFF Occitanie Viticulture https://draaf.occitanie.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/3_viticulture_moy_reso_imp_image_300dpi_cle88d2c1.pdf

DRAFF (2014b) Languedoc-Roussillon DRAFF Occitanie Productions végétales https://draaf.occitanie.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/4_prodveg_moy_reso_imp_image_300dpi_cle0e219b.pdf

DREAL (2015) « La consommation d'espaces en Languedoc-Roussillon ». http://www.occitanie.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/plaquette_conso_espace_nov_2015.pdf

Dukes S & Mooney HA (1999) Does global change increase the success of biological invaders? Trends in Ecology & Evolution, 14(4), 135-139.

Dunn RR (2005) Modern Insect Extinctions, the Neglected Majority Extinciones Modernas de Insectos, la Mayoría Desatendida. Conservation Biology, 19(4): 1030-1036.

Early R, Bradley BA, Dukes JS, et al (2016) Global threats from invasive alien species in the twenty-first century and national response capacities. Nature Communications, 7:12485. doi: 10.1038/ncomms12485

EEA (2006) Urban sprawl in Europe. European Environment Agency, Luxembourg

Egerer MH, Arel C, Otoshi MD, et al (2017) Urban arthropods respond variably to changes in landscape context and spatial scale. Journal of Urban Ecology 3:. https://doi.org/10.1093/JUE/JUX001

Eggleton P (2020) Annual Review of Environment and Resources The State of the World's Insects. https://doi.org/10.1146/annurev-environ-012420

Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/227328058_Eilenberg_J_Hajek_A_Lomer_C_Suggestions_for_unifying_the_terminology_in_biological_control_BioControl

Espadaler X & Bernal V (2015) *Lasius neglectus*, a polygynous, sometimes invasive ant. http://www.creaf.uab.es/xeg/lasius/Ingles/distribution.htm.

Espadaler X & Rey S (2001) Biological constraints and colony founding in the polygynous invasive ant *Lasius neglectus* (Hymenoptera, Formicidae). Insectes soc. 48: 159-164

Estes JA et al (2011) Trophic downgrading of planet earth. Science, 333: 301–306.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology ;14(8):2611-20. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x. PMID: 15969739.

Evans T, Forschler BT, Grace JK (2011) Biology of Invasive Termites: https://www.annualreviews.org/journal/ento A Worldwide Review. Annual Review of Entomology, 58:120928130709004. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153554

Fischer J & Lindenmayer DB (2007) Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. Global Ecology and Biogeography 16, 265-280.Fischer LK, Von Der Lippe M,

Kowarik I (2009) Tree invasion in managed tropical forests facilitates endemic species. Journal of Biogeography 36:2251–2263. doi: 10.1111/j.1365-2699.2009.02173.x

Fluker SS, Huddleston EW, Beardsley JW (1968) Some effects of the big-headed ant on populations of the pink sugarcane mealybug. Journal of Economic Entomology, 61:474–477.

Folgarait PJ (1998) Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. Biodiversity and Conservation 7, 1221–1244.

Frantz AC, Cellina S, Krier A, Schley L, Burke T (2009) Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? Journal of Applied Ecology, 46,493-505.

Freitag A (2016) Biodiversité 2010 en ville de Neuchâtel : les fourmis (Hyménoptères Formicidae). Bulletin de la société neuchâteloise des sciences naturelles. 133, 183-200

Freitag A & Cherix D (2019) *Tapinoma magnum* Mayr, 1861, une nouvelle espèce de fourmi introduite en Suisse (Hymenoptera, Formicidae), 12.

Frouz J & Jilková V (2008) The effect of ants on soil properties and processes (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News, 11(August), 191–199.

Gago EJ, Roldan J, Pacheco-Torres R, Ordóñez J (2013) The city and urban heat islands: A review of strategies to mitigate adverse effects. Renewable and Sustainable Energy Reviews 25:749–758. https://doi.org/10.1016/J.RSER.2013.05.057

Gamblin A & Bruyelle P (1999) Les littoraux - espaces de vie. Paris : Sedes (Dossiers des images économiques du monde), 312 p.

Gaston KJ (2010) Urban Ecology. Urban Ecology (ed K.J. Gaston), pp. 1±9. Cambridge University Press, Cambridge.

Gibb H & Hochuli DF (2002) Habitat fragmentation in an urban environment: large and small fragments support different arthropod assemblages. Biological Conservation 106:91–100. https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00232-4

Gibb H & Parr CL (2010) How does habitat complexity affect ant foraging success? A test using functional measures on three continents. Oecologia 164:1061–1073.

Gilbert O L (1971) Some indirect effects of air pollution on bark-living invertebrates. Journal of Applied Ecology 77-84. 8.

Gilbert OL (1989) The Ecology of Urban Habitats. Chapman & Hall, London

Gippet J (2016) Patterns of distribution, human-mediated dispersal and intraspecific variations in urbanized landscapes: how ants respond to urbanization. Ecology, environment. Université de Lyon. English. ffNNT: 2016LYSE1286ff. fftel-01474876

Gippet JM, Liebhold AM, Fenn-Moltu G, Bertelsmeier C (2019) Human-mediated dispersal in insects. Current Opinion in Insect Science, 35:96–102

Gippet JMW, George L, Bertelsmeier C (2022) Local coexistence of native and invasive ant species is associated with micro-spatial shifts in foraging activity. Biological Invasions 24:761–773. https://doi.org/10.1007/S10530-021-02678-2

Giraud T, Pedersen JS, Keller L (2002) Evolution of supercolonies: The Argentine ants of southern Europe. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99: 6075–6079.

Gortat T, Rutkowski R, Gryezynska A, Pieniazek A, Kozakiewicz A, Kozakiewiez M (2013) Genetic structure in urban and rural populations of Apodemus agrarius in Poland. Mammalian Biology, 78, 171–177. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2012.07.155

Gotelli NJ, Ellison AM, Dunn RR, Sanders NJ (2011) Counting Ants (Hymenoptera: Formicidae): Biodiversity Sampling and Statistical Analysis for Myrmecologists. Myrmecological News

Gouraud C & Kaufmann B (2022) Nouvelles observations des fourmis invasives du complexe des *Tapinoma gr. nigerrimum* dans le Massif armoricain (Hymenoptera : Formicidae). Invertébrés Armoricains, 23 : 23-38

Greenslade PJM (1973) Sampling ants with pitfall traps: Digging-in effect. Insectes Sociaux, 20: 343-353.

Griffith AMD, Veech JA, Marsh Maintainer Daniel M Griffith CJ (2016) Package "cooccur" Type Package Title Probabilistic Species Co-Occurrence Analysis in R. https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2012.00789.x

Grimm NB, Foster D, Groffman P et al (2008) The changing landscape: ecosystem responses to urbanization and pollution across climatic and societal gradients. Frontiers in Ecology and the Environment, 6: 264-272

Gruber B & Adamack AT (2015) landgenreport: A new R function to simplify landscape genetic analysis using resistance surface layers. Molecular Ecology Resources, 15(5), 1172–1178. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12381

Guénard B, Weiser, MD, Gomez K, Narula N, Economo EP (2017) The Global Ant Biodiversity Informatics (GABI) database: synthesizing data on the geographic distribution of ant species (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News, 24, 83–89.

Guillera-Arroita G (2017) Modelling of species distributions, range dynamics and communities under imperfect detection: advances, challenges and opportunities. Ecography (Cop) 40: 281–295. https://doi.org/10.1111/ECOG.02445

Gurevitch J & Padilla DK (2004) Are invasive species a major cause of extinctions? Trends in Ecology & Evolution 19:470–474. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2004.07.005

Hallmann CA, Sorg M, Jongejans E, Siepel H, Hofland N, Schwan H, Stenmans W, Müller A, Sumser H, Hörren T, Goulson D, de Kroon H (2017) "More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas." PLOS ONE, 12(10): e0185809.

Harris R & Berry J (2005) Invasive ant threat. Information Sheet Number 24. *Solenopsis geminata*. Landcare Research, New Zealand http://www.landcareresearch.co.nz/__data/assets/pdf_file/0009/51030/24.pdf

Hedin J & Ranius T (2002) Using radio telemetry to study dispersal of the beetle *Osmoderma eremita*, an inhabitant of tree hollows. https://www.journals.elsevier.com/computers-and-electronics-in-agricultureComputers and Electronics Agriculture 35, 171–180. doi:10.1016/S0168-1699(02)00017-0

Heller NE (2004) Colony structure in introduced and native populations of the invasive Argentine ant, *Linepithema humile*. Insectes Sociaux, 51:378–386. https://doi.org/10.1007/S00040-004-0770-0

Heller NE, Gordon DM (2006) Seasonal spatial dynamics and causes of nest movement in colonies of the invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). Ecological Entomology 31:499–510. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2006.00806.x

Heller G (2011) *Pheidole pallidula* (NYLANDER, 1849) und *Tapinoma nigerrimum* (NYLANDER, 1886) (Hymenoptera: Formicidae), etablierte Neozoa in Rheinland-Pfalz. Mainzer naturwissenschaftliches Archiv 48: 273-281.

Hellmann JJ, Byers J E, Bierwagen BG, Dukes JS (2008) Five potential consequences of climate change for invasive species. Conservation biology, 22(3), 534- 543.

Helms JA & Kaspari M (2015) Reproduction-dispersal tradeoffs in ant queens. Insectes Sociaux 62, 171–181.

Heterick BE, Lythe M, Smithyman C (2013) Urbanisation factors impacting on ant (Hymenoptera: Formicidae) biodiversity in the Perth metropolitan area, Western Australia: Two case studies. Urban Ecosystems, 16:145–173. https://doi.org/10.1007/s11252-012-0257-0

Hobbs RJ, Higgs E, Harris JA (2009) Novel ecosystems: implications for conservation and restoration. Trends in Ecoogy & Evolution 24, 599–605.

Hodkinson DJ & Thompson K (1997) Plant Dispersal: The Role of Man. The Journal of Applied Ecology, 34:1484. https://doi.org/10.2307/2405264

Hoffmann BD, Abbott KL, Davis P (2010) Invasive Ants management. In: Lach L, Parr CL, Abbott KL (Eds), Ant Ecology, Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 287–304.

Hölldobler B (1977) Communication in social Hymenoptera. In How Animals Communicate. (T.A. Sebeok Ed.), Indiana University Press, Bloomington, pp. 418–471.

Hölldobler B & Wilson EO (1990) The ants. Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Hölldobler B & Wilson EO (1995) Journey to the ants: a story of scientific exploration. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, and London: 1994. Pp 224:94 colour illustrations.

Holway DA, Suarez AV, Case TJ (1998) Loss of intraspecific aggression in the success of a widespread invasive social insect. Science 283: 949–952.

Holway DA & Suarez AV (1999) Animal behavior: an essential component of invasion biology. Trends in Ecology & Evolution 14:328-330.

Holway DA, Lach L, Suarez A V, Tsutsui N D, Case T J (2002) The Causes and Consequences of Ant Invasions. Annual Review of Ecology and Systematics, 33(1), 181–233. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150444

Huddleston EW & Fluker SS (1968) Distribution of ant species in Hawaii. Proceeding Hawaiian Entomological Society, 20:45–69.

Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: Managing invasive species pathways in an era of globalization. Journal of Applied Ecology, 46, 10±18

Hulme PE, Pyšek P, Jarošík V, et al (2013) Bias and error in understanding plant invasion impacts. Trends in Ecology & Evolution 28:212–218. doi: 10.1016/j.tree.2012.10.010

Hunter MR & Hunter MD (2008) Designing for conservation of insects in the built environment. Insect Conservation and Diversity, 1, 189-196.

Hutchinson GE & MacArthur RH (2015) A Theoretical Ecological Model of Size Distributions Among Species of Animals. https://doi.org/101086/282063 93:117–125. https://doi.org/10.1086/282063

INPN https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/185188

INPN (2014) https://inpn.mnhn.fr/docs/communication/Inventaire%20_national%20_des_%20fourmis%20_de_%20France_%20metropolitaine.pdf

INSEE (2016) Dossier complet Commune de Montpellier. Montpellier Méditerranée Métropole Diagnostic de territoire

INSEE & SoeS (2009) L'Observatoire du littoral. Démographie et économie du littoral

INSEE (2018) https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405599?geo=COM-34172

INSEE (2021) https://www.insee.fr/fr/metadonnees/definition/c2190

INSEE (2022) Dossier complet – Commune de Montpellier (34172) ». https://www.insee.fr/fr/statistiques/2011101?geo=COM-34172

IUCN (2021) https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics

Jha S & Kremen C (2013) Urban land use limits regional bumble bee gene flow. Molecular Ecology, 22: 2483-2495. https://doi.org/10.1111/mec.12275

Jokimäki J, Suhonen J, Jokimäki-Kaisanlahti ML, Carbó-Ramírez P (2016) Effects of urbanization on breeding birds in European towns: Impacts of species traits. Urban Ecosystems 19:1565–1577. https://doi.org/10.1007/s11252-014-0423-7

Johnson LE, Bossenbroek JM, Kraft CE (2006) Patterns and pathways of the post-establishment spread of non-indigenous aquatic species across multiple spatial and temporal extents: the slowing invasion of inland lakes by the zebra mussel. Biological Invasions 8: 475-489

Jombart T (2008) Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24:1403–1405. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129

Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics 11:94. https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94

Jombart T & Collins C (2015) A tutorial for discriminant analysis of principal components (DAPC) using adegenet 2.0.0. Imperial College London, MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling.

Jones CG, Lawton J H, Shachak M (1994) Organisms as ecosystem engineers. Oikos, 69(3), 373-386.

Juc L (2007) Etude des risques liés à l'utilisation des pesticides organochlorés et impact sur l'environnement et la santé humaine. tel-00330431, 228.

Juvenaz DP, Lofgren CS, Miller RW (1990) *Steinernematid* nematode drenches for control of fire ants, *Solenopsis invicta*, in Florida. Florida Entomologist, 73, 190–193

Kark S, Iwaniuk A, Schalimtzek A, Banker E (2007) Living in the city: can anyone become an 'urban exploiter'? Journal of Biogeography, 34: 638-651. https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01638.x

Keddy PA (1992) Assembly and response rules: two goals for predictive community ecology. Journal of Vegetation Science 3:157–164. https://doi.org/10.2307/3235676

Keller L (1995) Social-life: the paradox of multiple-queen colonies. Trends in Ecology and Evolution, 10, 355–360.

Kenis M, Auger-Rozenberg M-A, Roques A, Timms L, Péré C, Cock M W, Settele J, Augustin S, Lopez-Vaamonde C (2009) Ecological effects of invasive alien insects. Pages 21-45 in D. W. Langor J. Sweeney, editors. Ecological Impacts of Non-Native Invertebrates and Fungi on Terrestrial Ecosystems. Springer Netherlands, Dordrecht.

Kerr RW (1977) Resistance to Control Chemicals in Australian Arthropod Pests. Australian Journal of Entomology, 16, 327–334

Khimoun A, Doums C, Molet M, et al (2020) Urbanization without isolation: The absence of genetic structure among cities and forests in the tiny acorn ant *Temnothorax nylanderi*. Biology Letters 16:. https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0741

King JR, Tschinkel WR, Ross KG (2009) A case study of human exacerbation of the invasive species problem: transport and establishment of polygyne fire ants in Tallahassee, Florida, USA Biological Invasions, 11, pp. 373-377

Konorov EA & Nikitin MA (2015) Amplification of *CYP9* genes as a preadaptation of the black garden ant *Lasius niger* to urban conditions. Molecular Biology 49, 403–407. https://doi.org/10.1134/S0026893315030103

Konorov EA (2018) Genomic Signatures of Selection between Urban and Rural Populations of Black Garden Ant *Lasius niger*. Russian Journal of Genetics 54, 218–225. https://doi.org/10.1134/S1022795418020102

Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al (2015) Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Molecular Ecology Resources 15:1179–1191. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387

Kowarik I (2011) Novel urban ecosystems, biodiversity, and conservation. Environmental Pollution Aug-Sep;159(8-9):1974-83. doi: 10.1016/j.envpol.2011.02.022. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21435761.

Kühn I, Durka W, Klotz S (2004) BiolFlor - a new plant-trait database as a tool for plant invasion ecology Diversity and Distributions, 10, pp. 363-365

Kumschick S, Devenish A, Kenis M, Rabitsch W, Richardson DM, Wilson JRU (2016) Intentionally introduced terrestrial invertebrates: patterns, risks, and options for management Biological Invasions, 18, pp. 1077-1088

Lach L, Parr C, Abbott K (2010) Ant ecology (Oxford, New York: Oxford University Press).

Landa BB, Castillo AI, Giampetruzzi A, et al (2020) Emergence of a Plant Pathogen in Europe Associated with Multiple Intercontinental Introductions. Applied and Environmental Microbiology 86: https://doi.org/10.1128/AEM.01521-19

Laumond C, Mauleon H, Kermarrec A (1979) Données nouvelles sur le spectre d'hôtes et le parasitisme du nématode entomophage Neoaplectana carpocapsae. Entomophaga, 24, 13–27

Lefeuvre (2013) Les invasions biologiques. Buchet/Chastel.

Legendre P & Gallagher ED (2001) Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. Oecologia 2001 1292 129 :271–280. https://doi.org/10.1007/S004420100716

Lenoir A & Galkowski C (2018) Sur la présence d'une fourmi envahissante (*Tapinoma magnum*) dans le Sud-Ouest de la France, 45(4), 449–453.

Lenoir A & Perdereau E (in prep) Chemotaxonomy of *Tapinoma* ants and some Dolichoderinae from Europe and North Africa with a new species from Spain.

Ley de la Vega C, Favennec J, Gallego-Fernández J, Pascual Vidal C (eds) (2012) Conservation des dunes côtières. Restauration et gestion durables en Méditerranée occidentale. UICN, Gland, Suisse et Malaga, Espagne. 124 p.

Lévêque C, Mounolou JC, Pavé A, Schmidt-Lainé C (2010) À propos des introductions d'espèces. Etudes Rurales 185:219–234. https://doi.org/10.4000/ETUDESRURALES.9172

Li Y, Wang J, Metzner W, Luo B, Jiang T, Yang S, et al (2014) Behavioral responses to echolocation calls from sympatric heterospecific bats: implications for interspecific competition. Behavioral Ecology and Sociobiology 68:657–667.

Longcore T & Rich C (2004), Ecological light pollution. Frontiers in Ecology and the Environment, 2: 191-198. https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0191:ELP]2.0.CO;2

Lovett GM, Traynor MM, Pouyat R V et al (2000) Atmospheric deposition to oak forests along an urban - Rural gradient. Environmental Science and Technology 34:4294–4300. https://doi.org/10.1021/ES001077Q

Lowe S, Browne M, Boudjelas S (2000) 100 of the world's worst invasive alien species. Aliens, 12:1-12.

Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M, Bazzaz FA (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. Ecological Applications, 10 : 689–710.

Mack RN & Lonsdale WM (2001) Humans as global plant dispersers: getting more than we bargained for. BioScience 51:95–102

Madre F, Vergnes A, Machon N, Clergeau P (2013) A comparison of 3 types of green roof as habitats for arthropods. Ecological Engineering 57:109–117. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.029

Mairie de Montpellier (2021) https://www.montpellier.fr/1125-les-espaces-verts-montpellier-ville-verte-.htm

Majer JD (1997) The use of pitfall traps for sampling ants – a critique. Mem Museum Victoria 56:323–329. https://doi.org/10.24199/J.MMV.1997.56.20

Mansour R, Suma P, Mazzeo G, La Pergola A (2012) Interactions between the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera: Formicidae) and the main natural enemies of the vine and citrus mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). Biocontrol Science and Technology 22: 527-537.

Marshall E & Shortle J (2005) Urban development impacts on ecosystems. Land use problems and conflicts: causes, consequences and solutions. Routledge, New York, 79-93.

Martin GS, Adriaens T, Hautier L, et al (2005) La Coccinelle asiatique / Insectes n° 136. Insectes Sociaux, 136:7–11

Marzluff J & Rodewald A (2008) Conserving Biodiversity in Urbanizing Areas: Nontraditional Views from a Bird's Perspective. Cities and the Environment

Mertl AL & Traniello JFA (2009) Behavioral evolution in the major worker subcaste of twig-nesting *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae): does morphological specialization influence task plasticity? Behavioral Ecology and Sociobiology, 63, 1411–1426.

McLean MA, Angilletta MJ, Williams KS (2005) If you can't stand the heat, stay out of the city: thermal reaction norms of chitinolytic fungi in an urban heat island. Journal of Thermal Biology 30: 384–391.

McDonnell MJ, Pickett STA, Pouyat RV (1993) The application of the ecological gradient paradigm to the study of urban effects. In: McDonnell MJ, Pickett STA (eds) Humans as components of ecosystems. Springer-Verlag, New York, pp 175–189

McDonnell MJ & Hahs AK (2008) The use of gradient analysis studies in advancing our understanding of the ecology of urbanizing landscapes: Current status and future directions. Landscape Ecology 23:1143–1155

McGill BJ, Enquist BJ, Weither E, Westoby M (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. Trends in Ecology and Evolution, 21, 178–185

McKinney ML, Lockwood JL (1999) Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction Trends in Ecology & Evolution, 14, pp. 450-453

McKinney ML (2002) Urbanization, biodiversity, and conservation. The impacts of urbanization on native species are poorly studied, but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. BioScience, 52: 883-890.

McKinney ML (2006) Urbanization as a major cause of biotic homogenization. Biological Conservation, 127:247-260.

McKinney ML & La Sorte FA (2007) Invasiveness and homogenization: synergism of wide dispersal and high local abundance. Global Ecology and Biogeography 16:394–400. https://doi.org/10.1111/J.1466-8238.2007.00296.X

McKinney ML (2008) Effects of urbanization on species richness: A review of plants and animals. Urban Ecosystems, 11:161–176. https://doi.org/10.1007/s11252-007-0045-4

Medley KA, Jenkins D G, Hoffman E A (2015) Human-aided and natural dispersal drive gene flow across the range of an invasive mosquito. Molecular Ecology, 24, 284–295.

Médail F & Quezel P (1999) Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. Conservation Biology, 13:1510–1513. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.98467.x

Menke SB, Booth W, Dunn RR, et al (2010) Is It Easy to Be Urban? Convergent Success in Urban Habitats among Lineages of a Widespread Native Ant. PLoS One 5:e9194. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009194

Menozzi MJ (2010) Comment catégoriser les espèces exotiques envahissantes. http://journals.openedition.org/etudesrurales 185:051–066. https://doi.org/10.4000/ETUDESRURALES.9043

McKee JK, Sciulli PW, Fooce CD, Waite TA (2004) Forecasting global biodiversity threats associated with human population growth. Biological Conservation, 115, 161– 164.

McIntyre NE (2000) Ecology of Urban Arthropods: a Review and a Call to Action. Annals of the Entomological Society of America, 93:825–835. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[0825:eouaar]2.0.co;2

Medail F & Quezel P (1999) Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. Conservation Biology, 13:1510–1513. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.98467.x

Miles LS, Rivkin LR, Johnson MTJ, et al (2019) Gene flow and genetic drift in urban environments. Molecular Ecology 28:4138–4151. https://doi.org/10.1111/MEC.15221

Mirenda JT & Vinson SB (1982) Single and multiple queen colonies of imported fire ants in Texas. Southwest Entomology, 7: 135–141.

Moffett MW (2012) Supercolonies of billions in an invasive ant: What is a society? Behavioral Ecology 23:925–933. https://doi.org/10.1093/BEHECO/ARS043

Moles AT, Flores-Moreno H, Bonser SP, et al (2012) Invasions: the trail behind, the path ahead, and a test of a disturbing idea. Journal of Ecology 100:116–127. https://doi.org/10.1111/J.1365-2745.2011.01915.X

Moller H (1996) Lessons for invasion theory from social insects. Biological Conservation, 78:125–142. https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00022-5

Monceau K, Bonnard O, Thiéry D (2014) *Vespa velutina*: A new invasive predator of honeybees in Europe. Journal of Pest Science, 87:1–16. https://doi.org/10.1007/S10340-013-0537-3/TABLES/1

Morel JL, Chenu C, Lorenz K (2015) Ecosystem services provided by soils of urban, industrial, traffic, mining, and military areas (SUITMAs). Journal of Soils and Sediments 8:1659–1666. https://doi.org/10.1007/S11368-014-0926-0

Moreno E & Carrascal LM (1993), Leg Morphology and Feeding Postures in Four Parus Species: An Experimental Ecomorphological Approach. Ecology, 74: 2037-2044. https://doi.org/10.2307/1940849

Moriconi-Ebrard F (2016) L'urbanisation du monde depuis 1950. Collection Villes

Morse N, Pellissier P, Cianciola E, Brereton R, Sullivan M, Shonka N, Wheeler T, McDowell W (2014) Novel ecosystems in the Anthropocene: a revision of the novel ecosystem concept for pragmatic applications. Ecology and Society 19.

Mount A & Pickering CM (2009) Testing the capacity of clothing to act as a vector for non-native seed in protected areas. Journal of Environmental Management 91: 168–179. doi:10.1016/j.jenvman.2009.08.002

Munshi-South J, Zak Y, Pehek E (2013) Conservation genetics of extremely isolated urban populations of the northern dusky salamander (*Desmognathus fuscus*) in New York City. PeerJ. https://doi.org/10.7717/peerj.64

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403:853–858

Nagy C, Tartally A, Vilisics F, Merkl O, Szita E, Szel G, Podlussany A , Redei D, Csosz S, Pozsgai G, Orosz A, Szovenyi G, Marko V (2009) Effects of the invasive garden ant, *Lasius neglectus* VAN LOON, BOOMSMA & ANDRASFALVY, 1990 (Hymenoptera: Formicidae), on arthropod assemblages: pattern analyses in the type supercolony. Myrmecological News. 12, 171-181.

Naranjo SE (2019) Assessing Insect Flight Behavior in the Laboratory: A Primer on Flight Mill Methodology and What Can Be Learned. Annals of the Entomological Society of America, 112(3), 182–199. doi: 10.1093/aesa/say041

New TR (2015) Insect conservation and urban environments (p. 244). Cham: Springer.

Noordijk J (2016) Leefwijze van *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera: Formicidae), een nieuwe exotische mier in Nederland. Entomologische Berichten 76(3), 86–93.

O'Dowd DJ, Green PT, Lake PS (2003) Invasional 'meltdown' on an oceanic island. Ecology Letters, 6, 812–817.

Oksanen J, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens HH, Wagner H (2013) Vegan: community ecology package. http://CRAN.R-project.org/package=vegan.

O'Loughlin LS & Green P T (2017) Secondary invasion: when invasion success is contingent on other invaders altering the properties of recipient ecosystems. Ecology and Evolution, 7: 7628–7637

Oster GF & Wilson EO (1976) Caste and ecology in the social insects. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA

Pagès J (2004) "Analyse Factorielle de Donnees Mixtes." Revue Statistique Appliquee 4: 93–111

Parker T & Nilon C (2008) Gray squirrel density, habitat suitability, and behavior in urban parks Urban Ecosystems, 11 (2008), p. 243

Parr CL & Gibb H (2010) Competition and the role of dominant ants. Ant Ecology (ed. by L. Lach C Parr and KL Abbott), 402 pp. Oxford University Press, New York, New York.

Passera L (1994) Characteristics of tramp species. In: Williams D.F. (Ed.): Exotic Ants: Biology, impact, and control of introduced species. Westview Press, Boulder, CO, USA, pp. 23-43.

Passera L & Keller L (1994) Mate availability and male dispersal in the Argentine ant *Linepithema humile* (Mayr) (=*Iridomyrmex humilis*). Animal Behaviour *48*, 361–369.

Passera L & Aron S (2005) Les fourmis : comportement, organisation sociale et évolution - Luc Passera, Serge Aron - Google Livres. https://books.google.fr/books?id=AVP_ts6LSVUC&printsec=frontcover&hl=fr#v=onepage&q&f=false.

Pauchard A, Kueffer C, Dietz H, Daehler CC, Alexander J, Edwards PJ, Arévalo JR, Cavieres L, Guisan A, Haider S, Jakobs G, McDougall K, Millar CI, Naylor BJ, Parks CG, Rew LJ, Seipel T (2009) Ain't no mountain high enough: Plant invasions reaching high elevations. Frontiers in Ecology and the Environment 7:479-486

Pavan PM & Trave R (1956) IV. Etudes sur les formicidae venin du Dolichoderide *Tapinoma nigerrimum* NYL.

Pecl GT, Araújo MB, Bell JD, Blanchard J, Bonebrake TC, Chen I-C, Clark TD, Colwell RK, Danielsen F, Evengård B, et al (2017) Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being. Science 355, eaai9214.

Pereira HM, Leadley PW, Proença V, Alkemade R, Scharlemann JPW, FernandezManjarrés JF, Araújo MB, Balvanera P, Biggs R, Cheung WWL et al (2010) Scenarios for global biodiversity in the 21st century. Science, 330, 1496–1501.

Perrin W (2019) Influence de la pression pastorale sur l'écologie des communautés de coléoptères coprophages et leurs rôles fonctionnels associés : implications pour la gestion des espaces naturels. Montpellier. Université de Montpellier 3 : thèse de doctorat, Biologie des populations et écologie, sous la direction de Jay-Robert, Pierre.

Perrings C, Dehnen-schmutz K, Touza J, Williamson M (2005) How to manage biological invasions under globalization.

Pey B, Laporte MA, Nahmani J, et al (2014) A Thesaurus for Soil Invertebrate Trait-Based Approaches. PLoS One 9:e108985. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108985

Pickett ST, Burch WR Jr, Dalton SE, Foresman TW, Grove JM, Rowntree R (1997) A conceptual framework for the study of human ecosystems in urban areas. Urban Ecosystems. 1:185–199.

Pickett ST, Cadenasso M L, Grove JM, Boone C G, Groffman P M, Irwin E, Kaushal SS, Marshall V, McGrath BP, Nilon CH, Pouyat R V, Szlavecz K, Troy A, Warren P (2011) Urban ecological systems: Scientific foundations and a decade of progress. Journal of Environmental Management, 92(3): 331-362.

Pimentel D, Zuniga R, Morrison D (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. Ecological Economics, 52(3), 273–288.

Pirnat J (2000) Conservation and management of forest patches and corridors in suburban landscapes. Landscape and Urban Planning 52:135–143. https://doi.org/10.1016/S0169-2046(00)00128-6

Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, et al (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. Journal of Heredity 95:536–539. https://doi.org/10.1093/jhered/esh074

Plowes NJR, Johnson RA, Hölldobler B (2013) Foraging behavior in the ant genus *Messor* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). Myrmecological News, 18, 33-49

Poinar GO (1979) Nematodes for biological control of insects. Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Inc

Porter SD & Savignano DA (1990) Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and 541 disrupts arthropod community. Ecology 71:2095–2106

Pouyat RV, Russell-Anelli J, Yesilonis ID, Groffman PM (2003) Soil carbon in urban forest ecosystems. In: Kimble JM, Heath LS, Birdsey RA, Lal R eds. The potential of U.S. forest soils to sequester carbon and mitigate the greenhouse effect. Boca Raton: CRC Press: 347-362.

Pouyat RV, Yesilonis ID, Nowak DJ (2006) Carbon Storage by Urban Soils In the United States. Journal of environmental quality, v. 35,.4 pp. 1566-1575. doi: 10.2134/jeq2005.0215

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959

Prunier JG, Kaufmann B, Fenet S, Picard D, Pompanon F, Joly P, Léna JP (2013) Optimizing the trade-off between spatial and genetic sampling efforts in patchy populations: towards a better assessment of functional connectivity using an individual-based sampling scheme. Molecular Ecology 22, 5516–5530.

Pysek P, Blackburn TM, Garcia-Berthou E et al (2017) Displacementand local extinction of native and endemic species. Impact of biological invasions on ecosystem services. Springer, New York, pp 157–175

QGIS Development Team (2019) QGIS, a free and open source geographic information system. Version 3.10.6.

Ranius T & Hedin J (2001) The dispersal rate of a beetle, *Osmoderma eremita*, living in tree hollows. Oecologia 126, 363–370. doi:10.1007/s004420000529

R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Rebele F (1994) Urban ecology and special features of urban ecosystems. Global ecology and biogeography letters, 173-187.

Renard J (1984) Le tourisme : agent conflictuel de l'utilisation de l'espace littoral en France. Norois, 121 (1): 45-61. http://dx.doi.org/10.3406/noroi.1984.7362

Retana J, Cerda Xim, Espadaler X (1992) Coexistence of two Sympatric Ant Species, *Pheidole pallidula* and *Tetramorium semilaeve* (Hymenoptera: Formicidae). Entomologia Generalis 29–40. https://doi.org/10.1127/ENTOM.GEN/17/1992/29

Rey S & Espadaler X (2005) Area-wide management of the invasive garden ant *Lasius neglectus* (Hymenoptera: Formicidae) in Northeast Spain. Journal of Agricultural and Urban Entomology 21:99–112

Ribeiro PL, Camacho A, Navas CA (2012) Considerations for Assessing Maximum Critical Temperatures in Small Ectothermic Animals: Insights from Leaf-Cutting Ants. PLoS One 7:e32083. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0032083

Richardson DM, Pysek P, Rejmanek M, Barbour MG, Dane Panetta F, West CJ (2000) « Naturalization and Invasion of Alien Plants : Concepts and Definitions », Diversity and Distribution, 6 : 93-107.DOI : 10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x

Rochat E, Manel S, Deschamps-Cottin M, Widmer I, Joost S (2017) Persistence of butterfly populations in fragmented habitats along urban density gradients: Motility helps. Heredity, 119, 328–338. https://doi.org/10.1038/hdy.2017.40

Rodriguez LF (2006) Can invasive species facilitate native species? Evidence of how, when, and why these impacts occur. Biological Invasions 8: 927–939, doi:10.1007/s 10530-005-5103-3

Roura-Pascual N, Bas JM, Hui C (2010) The spread of the Argentine ant: environmental determinants and impacts on native ant communities. Biological Invasions 12:2399–2412. https://doi.org/10.1007/s10530-009-9650-x

Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8: 103-106.

Ross KG, Vargo EL, Keller L, Trager JC (1993) Effect of a founder event on variation in the genetic sex-determining system of the fire ant *Solenopsis invicta*. Genetics, 135 : 843–854.

Ross KG & Keller L (1995) Ecology and evolution of social organization: insights from fire ants andother highly eusocial insects. Annual Review of Ecology and Systematics 26:631–656

Rosset H & Chapuisat M (2007) Alternative life-histories in a socially polymorphic ant. Evolutionary Ecology, 21, 577–588.RStudio Team (2015) RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Inc., Boston, MA URL http://www.rstudio.com/.

RStudio Team (2015) RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, Boston, MA.

Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, et al (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science, 287:1770–1774. doi: 10.1126/science.287.5459.1770

Sánchez-Bayo F & Wyckhuys KAG (2019) Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020

Savolainen R & Vepsäläinen K (1988) A competition hierarchy among boreal ants: impact on resource partitioning and community structure. Oikos 51:135–155.

Sax DF, Stachowicz JJ, Gaines SD (2005) eds: Species invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography. Sunderland, Massachusets: Sinauer Associates

Schifani E (2019) Exotic Ants (Hymenoptera, Formicidae) Invading Mediterranean Europe: a Brief Summary over 200 Years of documented introductions. Sociobiology. 66. 198-208. http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v66i2.4331

SCOT Le schéma de cohérence territorial (2006) https://www.montpellier3m.fr/sites/default/files/t2_padd.pdf

SCOT Le schéma de cohérence territorial (2019) Tome 1 Rapport de présentation https://www.montpellier3m.fr/scot

Scottish Greenspace (2008) What is green space? http://www.greenspacescotland.org.uk

Seifert B (2000) Rapid range expansion in *Lasius neglectus* (Hymenoptera, Formicidae) an Asian invader swamps Europe. Deutsche Entomol Zeitschrift 47:173–179

Seifert B (2016) Clypeal excision in *Tapinoma* FÖRSTER, 1850 ants is adaptive (Hymenoptera: Formicidae). Contributions to Entomology 66: 1-5.

Seifert B, D'Eustacchio D, Kaufmann B, Centorame M, Modica M (2017) Four species within the supercolonial ants of the *Tapinoma nigerrimum* complex revealed by integrative taxonomy (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News, 24:123-144.

Seress G, Lipovits A, Bokony V, Czuni L (2014) Quantifying the urban gradient: a practical method for broad measurements. Landscape and Urban Planning 131:42–50

Shea K & Chesson P (2002) Community ecology theory as a framework for biological invasions. Trends in Ecology & Evolution 17:170–176. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02495-3

Silverman J & Brightwell RJ (2008) The Argentine Ant: Challenges in Managing an Invasive Unicolonial Pest. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093450

Simberloff D & Gibbons L (2004) Now you see them, now you don't!—population crashes of established introduced species. Biological Invasions 6:161–172. doi:10.1023/b:binv.0000022133.49752.46

SOeS (2006) Le Service de l'observation et des statistiques https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/Spear D, Foxcroft LC, Bezuidenhout H, McGeoch MA (2013) Human population density explains alien species richness in Bibliographie générale 263 protected areas. Biological Conservation, 159:137–147. doi: 10.1016/j.biocon.2012.11.022

Speight MR, Hails RS, Gilbert M, Foggo A (1998) Horse chestnut scale (*Pulvinaria regalis*) (Homoptera: Coccidae) and urban host tree environment. Ecology 1503–1513. 79.

Stanners D & Bordeaux P (1995) Europe's Environment – The Dobris assessment. European Environment Agency, Copenhagen.

Steffen W, Broadgate W, Deutsch L, Gaffney O, Ludwig C (2015) The trajectory of the Anthropocene: The Great Acceleration. The Anthropocene Review, 2053019614564785. doi:10.1177/2053019614564785

Stork NE (2009) Biodiversity IN Encyclopedia of INSECTS. Resh VH, Cardé RT (Eds.). Second Edition, Vol. 53. London, UK: Academic Press, Elsevier. 75-80.

Stork NE, McBroom J, Gely C, Hamilton AJ (2015) New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112. 7519–23.

Stuble KL, Kirkman LK, Carroll CR (2010) Are red imported fire ants facilitators of native seed dispersal? Biological Invasions 12, 1661–1669.

Suarez AV, Bolger DT, Case TJ (1998) Effects of Fragmentation and Invasion on Native Ant Communities in Coastal Southern California. Ecology 79 :2041. https://doi.org/10.2307/176708

Suarez AV, Richmond JQ, Case TJ (2000) Prey selection in Horned lizards following the invasion of the Argentine Ants in soutern California. Ecological Applicationshttps://www.researchgate.net/journal/Ecological-Applications-1939-5582 10:711±725.

Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2001) Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: insights from Argentine ants, PNAS, 98: 1095-1100.

Tartally A (2006) Long term expansion of a supercolony of the invasive garden ant, *Lasius neglectus* (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecologische Nachrichten 9:21–25

Tartally A, Antonova V, Espadaler X (2016) Collapse of the invasive garden ant, *Lasius neglectus*, populations in four European countries. Biological Invasions 18**,** 3127–3131 (2016). https://doi.org/10.1007/s10530-016-1227-x

Tassin J & Kull CA (2015) Facing the broader dimensions of biological invasions. Land use policy 42:165–169. doi: 10.1016/j.landusepol.2014.07.014

Thévenot J (2013) "Synthèse et réflexions sur des définitions relatives aux invasions biologiques." Préambule aux actions de la stratégie nationale sur les EEE ayant un impact négatif sur la biodiversité. Service du patrimoine naturel, Muséum national d'histoire naturelle, Paris: 31.

Thompson K, Hodgson JG, Thompson TCGR, et al (1995) Native and alien invasive plants: more of the same? Ecography (Cop) 18:390–402. https://doi.org/10.1111/J.1600-0587.1995.TB00142.X

Thompson RM, Brose U, Dunne JA, Hall Jr RO, Hladyz S, Kitching RL, Martinez ND, Rantala H, Romanuk TN, Stouffer DB, et al (2012) Food webs: reconciling the structure and function of biodiversity. Trends in Ecology & Evolution, 27, 689–697.

Thomsen MS (2010) Experimental evidence for positive effects of invasive seaweed on native invertebrates via habitat-formation in a seagrass bed. Aquatic Invasions 5:341–346. https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.4.02

Tittensor DP, Walpole M, Hill SL, Boyce D G, Britten GL, Burgess N D, ..., Baumung R (2014) A mid-term analysis of progress toward international biodiversity targets. Science, 346(6206), 241-244.

Torterotot JB & Caudron A (2018) Quel potentiel des outils génétiques pour étudier le rétablissement de la connectivité des habitats piscicoles ? Sciences Eaux & Territoires n°25 pages 62 à 67

Tsutsui ND & Case TJ (2001) Population genetics and colony structure of the Argentine ant (*Linepithema humile*) in its native and introduced ranges. Evolution (N Y), 55:976–985. https://doi.org/10.1111/J.0014-3820.2001.TB00614.X

Tsutsui ND & Suarez AV (2003) The colony structure and population biology of invasive ants. Conservation biology, 17(1), 48-58.

Tuma J, Eggleton P, Fayle T (2020) Ant-termite interactions: an important but under-explored ecological linkage. Biological Reviews, 95:555–72

Ugelvig LV, Drijfhout FP, Kronauer DJC, et al (2008) The introduction history of invasive garden ants in Europe: Integrating genetic, chemical and behavioural approaches. BMC Biology 6:1–14. https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-11/TABLES/3

UNFPA (2010) Wold Urbanization Prospects: The 2009 Revision. Hautes lumières. Département des affaires économiques et sociales. Division de la population. Nations Unies, New York

Valéry L, Fritz H, Lefeuvre J-C, Simberloff D (2008) In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. Biological invasions, 10(8): 1345-1351.

Valéry L, Fritz H, Lefeuvre JC, Simberloff D (2009) Invasive species can also be native... Trends in Ecology & Evolution 24:585

Vanderwoude C, Haynes D, Richards E, Quinquis B, Moverley D, Skelton PA (2014) Gestion des impacts de la petite fourmi de feu (*Wasmannia auropunctata*) en Polynésie française – Apia (Samoa) : PROE.

Van Lenteren JC (2012) IOBC Internet Book of Biological Control, version 6, 182.

Venter O, Sanderson EW, Magrach A, Allan JR, Beher J, Jones KR, Possingham HP, Laurance WF, Wood P, Fekete BM, Levy MA, Watson JEM (2016) Sixteen years of change in the global terrestrial human footprint and implications for biodiversity conservation. Nature Communications, 7, 12558. doi:10.1038/ncomms12558

Vergnes A (2012) Connectivité des paysages urbains et faune épigée : approche multi-échelles et multi-taxons. Muséum national d'histoire naturelle, 1-248

Vergnes A, Kerbiriou C, Clergeau P (2013) Ecological corridors also operate in an urban matrix: A test case with garden shrews. Urban Ecosystems 16:511–525. https://doi.org/10.1007/S11252-013-0289-0/TABLES/2

Vergnes A, Pellissier V, Lemperiere G, et al (2014) Urban densification causes the decline of ground-dwelling arthropods. Biodiversity and Conservation 23:1859–1877. https://doi.org/10.1007/S10531-014-0689-3

Vergnes A, Blouin M, Muratet A, Lerch T Z, Mendez-Millan M, Rouelle-Castrec M, Dubs F (2017) Initial conditions during Technosol implementation shape earthworms and ants diversity. Landscape and Urban Planning, 159: 32-41.

Vergnes A (2020) Impact des aménagements urbains sur la biodiversité du sol. Smart city - V intelligente. https://doi.org/10.51257/A-V1-GE1068

Vinson SB (1994) Impact of the invasion of *Solenopsis invicta* (buren) on native food webs D.F. Williams (Ed.), Exotic Ants: Biology, Impact, and Control of Introduced Species, Westview Press, Boulder, CO, pp. 241-258

Violle C, Navas ML, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I et al (2007) Let the concept of trait be functional!. Oikos, 116, 882–892

Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human domination of Earth's ecosystems. Science, 277: 494-499.

Vonshak M, Dayan T, Ionescu-Hirsh A, et al (2010) The little fire ant *Wasmannia auropunctata*: A new invasive species in the Middle East and its impact on the local arthropod fauna. Biological Invasions 12:1825–1837. https://doi.org/10.1007/s10530-009-591 9593-2

Wang J (2011) coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. Molecular Ecology Resources, 11: 141-145. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02885.x

Wang L, Xu Y J, Zeng L, Lu YY (2019) Impact of the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren on biodiversity in South China: A review. Journal of Integrative Agriculture, 18:788–796. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62014-3

Ward DF, New TR, Yen AL (2001) Effects of pitfall trap spacing on the abundance, richness and composition of invertebrate catches. Journal of Insect Conservation

Ward D (2009) Potential social, economic and biodiversity impacts of the Argentine ant, *Linepithema humile* in the Hawke's Bay region. Landcare Research.

Warren PS, Katti M, Ermann M, Brazel A (2006) Urban bioacoustics: It's not just noise. Animal Behaviour 71:491–502. https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2005.07.014

Wetterer J & Porter S (2003) The Little Fire Ant, *Wasmannia auropunctata*: Distribution, Impact and Control. Sociobiology, 41, 1-41.

Wetterer JK, Espadaler X, Wetterer AL, Aguin-Pombo D, Franquinho-Aguiar AM (2006) Long-term impact of exotix ants on the native ants of Madeira. Ecological Entomology, 31, 358-368

Wetterer JK (2007) Biology and Impacts of Pacific Island Invasive Species. 3. The African Big-Headed Ant, *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: Formicidae), Pacific Science, 61(4), 437-456, (1 October 2007). https://doi.org/10.2984/1534-6188(2007)61[437:BAIOPI]2.0.CO;2

Wichmann MC, Alexander MJ, Soons MB, Galsworthy S, Dunne L, Gould R, Fairfax C, Niggemann M, Hails RS, Bullock JM (2009) Human-mediated dispersal of seeds over long distances. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 276: 523-532. doi:10.1098/rspb.2008.1131

Wilby RL & Perry GLW (2006) Climate change, biodiversity and the urban environment: a critical review based on London, UK. Progress in Physical Geography: Earth and Environment.;30(1):73-98. doi:10.1191/0309133306pp470ra

Williamson M (1996) Biological invasions. Chapman & Hall, London.

Wilson EO & Taylor RW (1967) The ants of Polynesia (Hymenoptera : Formicidae). Pacific Ins. Mon., 14: 1–109.

Wilson EO (1971) The Insect Societies. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.

Wilson EO (1987) The Little Things That Run the World (The Importance and Conservation of Invertebrates). Conservation Biology 1:344–346

Wilson EO & Hölldobler B (2005) The rise of the ants: a phylogenetic and ecological explanation. Proceeding of National Academy Sciences USA, 102, 7411–7414.

With KA & King AW (1999) Extinction thresholds for species in fractal landscapes. Conservation Biology 13, 314-326

Witte R, Diesing D, Godde M (1985) Urbanophobe, urbanoneutral, urbanophile - behavior of species concerning the urban habitat Flora, 177, pp. 265-282

Wittman SE (2014) Impacts of invasive ants on native ant communities (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News 19:111–12

Yamamoto J, Uchida K, Takami Y (2013) Colonization and persistence of urban ant populations as revealed by joint estimation of kinship and population genetic parameters. The Journal of heredity 104:639–648. https://doi.org/10.1093/JHERED/EST04

Zhivotovsky LA (2015) Relationships Between Wright's FST and FIS Statistics in a Context of Wahlund Effect. Journal of Heredity 106, 306–309.

Liste d’articles & Activités d’enseignement et d’encadrement

Publications

En preparation Centanni J, Dumet A, Blatrix R, Blight O, Seifert B, Centorame M, Jay-Robert P, Vergnes A, Kaufmann B Compared of genetic structuring patterns of three ant species of the genus *Tapinoma* co-occuring in urban landscape.

2022 Centanni J, Kaufmann B, Blatrix R, Blight O, Dumet A, Jay-Robert P, Vergnes A High resolution mapping in Southern France reveals distributions of supercolonial and monodomous species in the *Tapinoma nigerrimum* complex (Hymenoptera: Formicidae) are related to sensitivity to urbanization. Myrmecological News.

Autres publications

Soumis Chapuis M, Piou C, Leménager N, Roumet P, Marche H, Centanni J, Estienne C, Ecarnot M, Vasseur F, Violle C, Kazakou E Domestication provides durum wheat with protection from locust herbivory. Ecology and Evolution

2022 Centanni J Searching for ants of the *Tapinoma nigerrimum* complex in the south of France Photoblog By Myrmecological News blog https://blog.myrmecologicalnews.org/2022/02/09/searching-for-ants-of-the-tapinoma-nigerrimum-complex-in-the-south-of-france/

2021 Mao Z, Centanni J, Pommereau F, Stokes A, Gaucherel C Maintaining biodiversity promotes the multifunctionality of social-ecological systems: holistic modelling of a mountain system. Ecosystem Services 47:101220. https://doi.org/10.1016/J.ECOSER.2020.101220

2018 Ribardière A, Centanni J, Dano A, Coudret J, Daguin-Thiébaut C, Houbin C, Kerdoncuff E, Jambut S, Cordaux R, Broquet T Female-biased sex ratios unrelated to *Wolbachia* infection in European species of the *Jaera albifrons* complex (marine isopods). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 509:91–98. https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2018.09.002

Enseignements

2022 TD Module Biologie générale (L. Dormont) Licence 1 Psychologie, UPVM3 – 12 h
2021 TD Module Biologie générale (L. Dormont) Licence 1 Psychologie, UPVM3 – 24 h
2020 TD Module Biologie générale (L. Dormont) Licence 1 Psychologie, UPVM3 – 24 h
2020 TD Module Ethologie (A. Vergnes) Licence 3, UPVM3 – 24 h
2019 TD Module Biologie générale (L. Dormont) Licence 1 Psychologie, UPVM3 – 24 h

Encadrements

2020 Co-Encadrement à distance avec A. Vergnes (en raison des restrictions sanitaires liées au Covid), Marine Gervais, Master 1, Université Grenoble-Alpes. « Etude bibliographique sur les fourmis invasives en milieu urbain en France métropolitaine ».

2019 Co-encadrement avec A. Vergnes, Master 1, Ambre Mautuit, Université de Montpellier. « Effet du caractère envahissant des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* sur la myrmécofaune ».

2019 Encadrement Licence 3, Yannick Juvé, Université de Montpellier. « Etude de la répartition des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* ».

2019 Encadrement Licence 3, Célian Diblasi, Université de Montpellier. « Etude de la répartition des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* ».

2019 Encadrement Licence 3, Pierre-Louis Duarte, Université de Montpellier. « Etude de la répartition des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* ».

2019 Encadrement Mission locale, Corentin Sagnet. « Etude de la répartition des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* ».

2019 Encadrement Licence 2, Julien Tchilinguirian, Université de Montpellier. « Etude de la répartition des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* ».

2019 Encadrement Licence 1, Célia Lecomte, Université de Montpellier. « Etude de la répartition des fourmis du complexe *Tapinoma nigerrimum* ».

Annexe

Myrmecological News
ISSN 1997-3500
myrmecologicalnews.org
Myrmecol. News 32: 41-50 doi: 10.25849/myrmecol.news_032:041 9 February 2022
Original Article

High resolution mapping in Southern France reveals that distributions of supercolonial and monodomous species in the *Tapinoma nigerrimum* complex (Hymenoptera: Formicidae) are related to sensitivity to urbanization

Julia Centanni, Bernard Kaufmann, Rumsais Blatrix, Olivier Blight, Adeline Dumet, Pierre Jay-Robert & Alan Vergnes

Abstract

Urbanization modifies environments worldwide creating opportunities for the establishment of invasive species, natives or non-natives, a main driver of global change. To understand the process of biological invasion, we need to decipher the interactions between urbanization and species traits. Within the Mediterranean *Tapinoma nigerrimum* species complex (Hymenoptera, Formicidae), *Tapinoma darioi* Seifert & al., 2017 and *Tapinoma magnum* Mayr, 1861 have spread in continental European cities and exhibit "tramp"-species traits. In contrast, *T. nigerrimum* (Nylander, 1856) is not expanding its range and does not exhibit characteristics of tramp ant species. We investigated whether the distribution of these species differed in relation to land use. We chose Montpellier (Mediterranean France) as a study site because it combines the presence of all three species with rapid urbanization. Occurrence data were generated by systematically sampling all *Tapinoma* colonies over 926 sites, > 500 m away from one another, over a 60 × 25 km area. Species were identified using 15 microsatellite markers. Four land-cover classes (urbanization, agricultural, natural, water) were used for landscape analyses based on 250 m-radius buffer zones. *Tapinoma nigerrimum* was found at 197 sites (21.27% of occurrences), *T. darioi* at 78 sites (8.42%), and *T. magnum* at 6 sites (0.65%). The probability of occurrence of *T. darioi* was positively correlated with urbanization up to a threshold of 75% impervious land-cover, negatively correlated with natural land-cover, and was higher near the coast. In contrast, *T. nigerrimum* occurred less often at sites with impervious land-cover and near the coast, and more frequently in natural areas. These distinct distributions support an association between urbanization and species exhibiting tramp traits, and highlight the importance of adapting land management to control biological invasions.

Key words: *Tapinoma darioi*, urban landscape, Montpellier, *Tapinoma magnum*, Mediterranean region, microsatellite.

Received 23 June 2021; revision received 30 November 2021; accepted 1 December 2021
Subject Editor: Andrew V. Suarez

Julia Centanni (contact author), Rumsais Blatrix, Pierre Jay-Robert & Alan Vergnes, CEFE, Université Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Université Paul Valéry Montpellier 3, F-34199 Montpellier, France.
E-mail: julia-jane.centanni@univ-montp3.fr

Bernard Kaufmann & Adeline Dumet, Université Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France.

Olivier Blight, Avignon Université, Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, IMBE, F-84000 Avignon, France.

Introduction

Urbanization is land conversion leading to total or partial irreversible soil replacement by impervious surfaces (e.g., buildings, roads, parking lots, large-scale infrastructures) (McKinney 2006). It has mainly negative consequences on native biodiversity (McKinney 2002, 2006, Heterick & al. 2013, Cadotte & al. 2017), while creating opportunities for the establishment of some species which are adapted to disturbance caused by human activities (Vitousek & al. 1997, McKinney 2006, Cadotte & al. 2017). As urban areas are hubs of human activities, they are also a main point of species entry, release or escape and spread (Padayachee & al. 2017).

According to Valéry & al. (2008, 2009), invasive traits, which allow species to spread to new areas or habitats and reach high numbers or densities, can be acquired by both indigenous and non-indigenous species. Successful biological invasions may result from interactions between urbanization and species' ecological traits (Cadotte &

© 2022 The Author(s). OPEN ACCESS Open access, licensed under CC BY 4.0
https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

al. 2017). One way to investigate these interactions is to compare species that are closely related (i.e., that differ by only a few traits) and that co-occur spatially within an urbanized landscape (Cadotte & al. 2017). For example, a study of cryptic bat species showed that those two morphologically similar species may respond differently to urban landscapes (Lintott & al. 2016). One species is considered a generalist and tolerates moderate levels of urbanization (Hale & al. 2012, Lintott & al. 2016).

In the present study, we compared the distribution of cryptic ant species in the *Tapinoma nigerrimum* species complex (Hymenoptera, Formicidae) on a mosaic of land use. The *T. nigerrimum* species complex comprises four species found in the western Mediterranean region: *Tapinoma darioi* Seifert & al., 2017, *Tapinoma ibericum* Santschi, 1925, *Tapinoma magnum* Mayr, 1861, and *Tapinoma nigerrimum* (Nylander, 1856), the delineation of which has been clarified only recently (Seifert & al. 2017). Although similar morphologically, these species have been separated by NUMOBAT (Numeric Morphology-Based Alpha-Taxonomy) and by mtDNA (mitochondrial DNA), and have different ecological traits (Seifert & al. 2017). All species are native to the Mediterranean region, but their precise native ranges need further investigations, except for *T. ibericum*, which is found in Southern Spain only, and *T. nigerrimum*, whose distribution is restricted to Spain and Southern France. *Tapinoma nigerrimum* forms monodomous colonies that are aggressive to one another (Seifert & al. 2017). *Tapinoma darioi* and *T. magnum* show "tramp"-species traits (Seifert & al. 2017) and have established populations outside their native range (Dekoninck & al. 2015, Seifert & al. 2017). In addition to human-assisted dispersal and having a generalist diet, tramp species exhibit polygyny (i.e., multiple reproductive queens per nest), supercoloniality (i.e., numerous interconnected nests spread over a large area), mass recruitment (e.g., the capacity to rapidly gather foragers over a resource), and ecological dominance resulting in an exclusion of other ant species (Passera 1994, Holway & al. 2002).

While recent invasions of *Tapinoma darioi* and *Tapinoma magnum* have been documented in the Netherlands, Germany, and Belgium (Dekoninck & al. 2015, Seifert & al. 2017), these species also express invasive behaviours in Southern France (Blight & al. 2010, Berville & al. 2013). Coastal areas of Southern France have seen rapidly growing urbanization since the 1960's, and now feature contrasted land uses with juxtaposition of natural and urban areas. This is one of the few places where *Tapinoma nigerrimum*, the native species, occurs sympatrically with two invasive species of the complex, *T. darioi* and *T. magnum* (Seifert & al. 2017). The goal of our study was to study the contribution of land use to the spatial distribution of each species and interpret this contribution in light of the invasiveness-related traits known to differ between the species. To do so, we first had to develop a fast and reliable method based on microsatellite markers for the unambiguous identification of the four species within the *T. nigerrimum* species complex. These microsatellite markers also allowed the identification of other species outside this complex (e.g., *Tapinoma erraticum*, Latreille, 1798 and *Tapinoma madeirense*, Forel, 1895).

Then, we made a high-resolution mapping of the distribution of each species of the complex and linked their occurrences with urbanization levels, measured as the proportions of land-cover classes, that is, impervious, agricultural, and natural. We hypothesize a positive relationship between level of urbanization and the occurrence of *Tapinoma darioi* and *Tapinoma magnum*.

Materials and methods

Study area

The study area is located in Southern France, along the Mediterranean coast. Sampled sites are distributed from the sea-shore to the hills in the North of Montpellier, in a broad 20 × 60 km area parallel to the coast (Fig. S1, as digital supplementary material to this article, at the journal's web pages). The climate is characterized by mild, wet winters and hot, dry summers (Leroux 2001). From South to North, the landscapes consist of (1) alluvial coastal plains, with sandy dunes which separate large saltwater lagoons from the Mediterranean Sea, and (2) plateaux and hills made of layers of marine sedimentary limestone that underwent folding and faulting during the Pyrenean orogeny, dominated by Mediterranean shrublands and mostly oak forests. Agricultural areas (e.g., fields, vineyards, orchards, olive groves) are present between the lagoons and the hills, wherever urbanization has not taken hold (Bornand & al. 1997, Myers & al. 2000).

The sampled areas include the urban areas of Sète (43° 24' N, 3° 42' E; 90,720 inhabitants), Montpellier (43° 36' N, 3° 52' E; 457,839 inhabitants), Lunel (43° 40' N, 4° 08' E; 48,672 inhabitants), and Nîmes (43° 50' N, 4° 21' E; 268,785 inhabitants) (Fig. 1; INSEE 2017, 2018). Since 1968, the population of all the urban areas combined has doubled (INSEE 2020) due to the simultaneous urbanization of the shoreline for mass tourism and the uncontrolled urban spread as a result of new inhabitants (Direction Départementale Des Territoires et de la Mer de l'Hérault 2016). There are, however, strong heterogeneities in population dynamics among the four urban areas, with Montpellier and Lunel showing the strongest population growth (2.5 and 2.4-fold growth, respectively) and Sète and Nîmes well below (1.5 and 1.7-fold, respectively).

Biological model

Species identification in the field is impossible within the *Tapinoma nigerrimum* complex and is made even more difficult by the presence of other species of the genus *Tapinoma*, such as *T. erraticum* or *T. madeirense*. *Tapinoma simrothi* Krausse, 1911, which can be found in Southern Spain and Italy, belongs to another species complex but is morphologically very similar to the species of

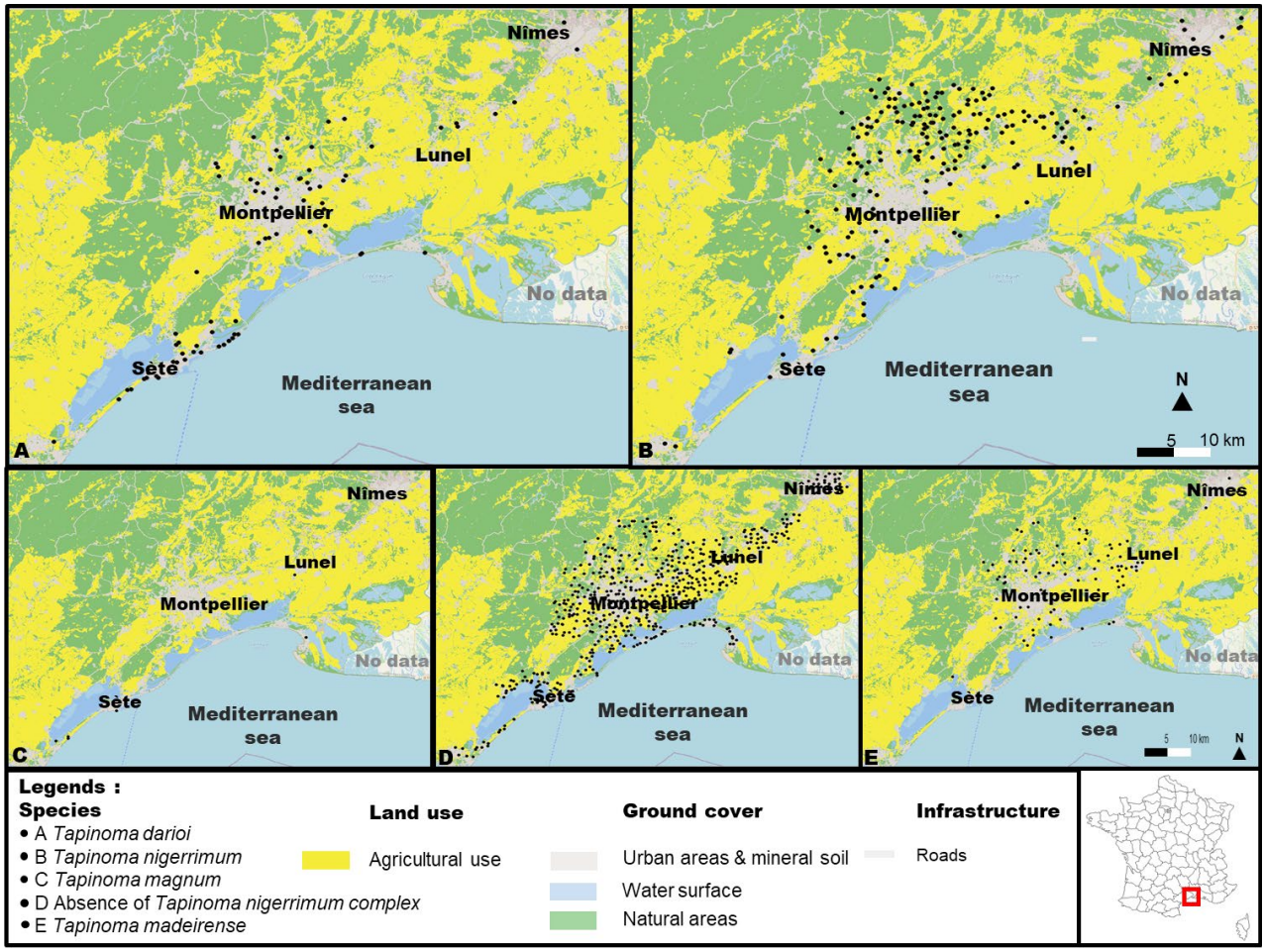


Fig. 1: Distribution maps of the three species of the *Tapinoma nigerrimum* complex found in the sampling area. Map D shows all sampled sites where no species of the *T. nigerrimum* complex could be found. Map E shows the occurrence of *Tapinoma madeirense* for information, although it is not part of the *Tapinoma nigerrimum* complex. *Tapinoma ibericum* was only present in Mèze (% urban = 0.86, close to the coast) and therefore not shown.

the *T. nigerrimum* complex. Although these other species have never been recorded in our study area, all *Tapinoma* colonies, regardless of species group, were sampled in the field for identification in the laboratory.

Sampling scheme

Based on a 1 km² mesh grid, 926 sampling points were semi-randomly positioned using the "random point under the influence of a layer" tool in QGIS version 3.10.6 (QGIS Development Team 2019) (excluding aquatic surfaces) and sampled once from March to July 2019 in dry weather, between 15 °C and 30 °C. This climate corresponds to the highest activity period of most ants, and it is optimal for *Tapinoma* (Blatrix & al. 2013).

Ants were collected in nests or on dense trails with an entomological aspirator or flexible forceps within a radius of 15 m around each sampling point (following Gippet & al. 2017) and along four 50 m transects (oriented North, South, East, West), when the configuration allowed it. In sites where *Tapinoma* occurred, 30 individuals from one nest were collected and preserved in 96% ethanol.

Genetic identification by microsatellites

Seifert & al. (2017) used NUMOBAT to define species within the *Tapinoma nigerrimum* species complex and to identify individuals to the species level. They also used mtDNA (Cytochrome Oxidase gene) sequencing, which supported the NUMOBAT taxonomy. However, a number of disagreements between NUMOBAT and mtDNA arose for *Tapinoma magnum* and *Tapinoma darioi* from Italy and from France.

NUMOBAT is time consuming (Klarica & al. 2011), and mtDNA markers do not give exact identifications in species complexes where hybridization or incomplete lineage sorting occur (as is the case in *Tapinoma nigerrimum* complex, Seifert & al. 2017). Following the methods developed in Cordonnier & al. (2019), 15 microsatellite markers designed for *Tapinoma magnum* to genotype one individual per colony collected were used. The details for microsatellite development, sequences, and primers can be found in Appendix S1, as digital supplementary material to this article, at the journal's web pages. The rationale behind identification by genotyping is that mutations that accumulate in microsatellite sequences should

Tab. 1: Results of Generalized Linear Models showing the effects of the variables on the occurrence of *Tapinoma nigerrimum*. % nat: percentage of natural areas, % urban: percentage of urbanization, % agri: percentage of area for agricultural use, distance: distance to the coast, interaction % urban distance: interaction between % urban and distance to the coast. Bold lines correspond to the best models by variable according to the Akaike Information Criteria (AIC).

Models	Formula	AIC	Estimate	Standard error	P-Value	Figures
% nat linear	**% natural**	**922.45**	**0.017987**	**0.002833**	**<0.001**	**Fig. 2. A**
% nat quadratic	% natural	924.44	1.710e-02	1.011e-02	0.08933	Not shown
	%natural²		9.588e-06	1.052e-04	0.92741	
% nat cubic	% natural	925.68	-1.435e-03	2.346e-02	0.9512	Not shown
	% natural²		5.212e-04	5.958e-04	0.3825	
	% natural³		-3.567e-06	4.092e-06	0.3838	
% urban linear	% urban	911.69	-0.025989	0.004051	<0.001	Not shown
% urban quadratic	% urban	902.94	-0.0613954	0.0115195	<0.001	Not shown
	% urban²		0.0005376	0.0001566	<0.01	
% urban cubic	**% urban**	**890.79**	**-1.513e-01**	**2.811e-02**	**<0.001**	**Fig. 2. C**
	% urban²		**3.807e-03**	**9.598e-04**	**<0.001**	
	% urban³		**-2.820e-05**	**8.513e-06**	**<0.001**	
% agri linear	% agri	957.67	0.005635	0.002534	<0.05	Not shown
% agri quadratic	**% agri**	**937.64**	**0.0462602**	**0.0091596**	**<0.001**	**Fig. S3. A**
	% agri²		**-0.0004993**	**0.0001095**	**<0.001**	
% agri cubic	% agri	935.64	8.226e-02	2.019e-02	<0.001	Not shown
	% agri²		-1.650e-03	5.822e-04	<0.01	
	% agri³		8.780e-06	4.340e-06	<0.05	
distance linear	**distance**	**901.67**	**6.884e-05**	**9.134e-06**	**<0.001**	**Fig. 2. E**
Interaction % urban distance	**distance**	**853.49**	**8.375e-05**	**1.147e-05**	**<0.001**	**Fig. S4. A**
	% urban3		**5.278e-06**	**1.367e-06**	**<0.001**	
	% urban		**-3.589e-02**	**7.698e-03**	**<0.001**	
	% urban3:distance		**-1.683e-10**	**6.293e-11**	**<0.01**	

result in strong differentiation over time, especially in species which are reproductively isolated. Microsatellites are, however, known to converge by homoplasy. To overcome this obstacle, several markers have to be analyzed together. In Cordonnier & al. (2019), five species of the ant genus *Tetramorium* Mayr, 1855 were identified with 17 highly polymorphic microsatellite markers, which also revealed numerous interspecific hybrids between two species (Cordonnier & al. 2018). In the present paper, the same approach was used, with one major difference: DNA of individuals that had been subjected to both NUMOBAT and mtDNA identification in Seifert & al. (2017) was used to assign species names to genotype groups defined by microsatellite analysis.

Microsatellite development

Fifteen markers were developed from *Tapinoma magnum* individuals: The total genomic DNA was isolated from the ants collected in Lyon in 2014. The DNA was extracted following crushing (3 min at 30 Hz in a Retsch MM200 ball mill, Haan, Germany), standard digestion (proteinase K (75 µg) + 200 µl of TNES buffer (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.5% SDS)), and salt-chloroform purification. The total genomic DNA was sent to GenoScreen, Lille, France, where 1 µg was used for the development of microsatellite libraries through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries as described in Malausa & al. (2011). The total DNA was mechanically fragmented and enriched for AG, AC, AAC, AAG, AGG, ACG, ACAT, and ATCT repeated patterns. The enriched fragments were subsequently amplified. The PCR products were purified, quantified, and the GS-FLX libraries were then carried out following the manufacturer's protocols and sequenced on a GS-FLX PTP. Details for microsatellite development, sequences, and primers can be found in Appendix S1. Primer characteristics and marker accession numbers can be found in Appendix S2, Table 1.

DNA extraction

The DNA from one individual per colony collected in the field was extracted by grinding each ant in proteinase K (10 µL at 15 mg / ml) and adding Chelex 7% (150 µL), followed by a 2-hour incubation at 55 °C and an additional 15 min at 90 °C to inactivate the proteinase K.

Genotyping

Fifteen microsatellite markers were organized into three genotyping mixes (Appendix S2, Tab. 1) and run through a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) by a service provider (GENTYANE, Clermont-Ferrand, France). Forward primers were end-labelled with universal tails following Blacket & al. (2012); four different tails were used with the following fluorescent dyes – Tail_A_6FAM [6FAM]GCCTCCCTCGCGCCA, Tail_B_

Tab. 2: Results of Generalized Linear Models with binomial logistic "error", showing the effects of the variables on the occurrence of *Tapinoma darioi*. % nat: percentage of natural areas, % urban: percentage of urbanization, % agri: percentage of area for agricultural use, distance: distance to the coast, interaction % urban distance: interaction between the % urban and distance to the coast. Bold lines correspond to the best models by variable according to the Akaike Information Criteria (AIC).

Models	Formula	AIC	Estimate	Standard error	P-Value	Figures
% natural linear	**% natural**	**528.94**	**-0.016144**	**0.005462**	**<0.01**	**Fig. 2. B**
% natural quadratic	% natural	528.81	0.0068496	0.0170569	0.6861	Not shown
	%natural²		-0.0003186	0.0002321	0.1438	
% natural cubic	% natural	530.38	-1.357e-02	3.573e-02	0.7039	Not shown
	% natural²		3.847e-04	1.117e-03	0.7286	
	% natural³		-5.905e-06	9.336e-06	0.5137	
% urban linear	% urban	504.39	0.025342	0.004307	<0.001	Not shown
% urban quadratic	**% urban**	**487.71**	**0.0941229**	**0.0180119**	**<0.001**	**Fig. 2. D**
	% urban²		**-0.0008457**	**0.0002137**	**<0.001**	
% urban cubic	% urban	485.42	1.694e-01	4.173e-02	<0.001	Not shown
	% urban²		-3.016e-03	1.065e-03	<0.01	
	% urban³		1.651e-05	7.740e-06	<0.05	
% agri linear	**% agri**	**509.48**	**-0.026834**	**0.005841**	**<0.001**	**Fig. S3. B**
% agri quadratic	% agri	511.31	-0.0204340	0.0163521	0.2129	Not shown
	% agri²		-0.0000992	0.0002400	0.6750	
% agri cubic	% agri	511.57	-6.089e-02	3.586e-02	0.07868	Not shown
	% agri²		1.523e-03	1.307e-03	0.22644	
	% agri3		-1.453e-05	1.184e-05	0.18748	
distance linear	**distance**	**518.93**	**-0.0000662**	**0.0000157**	**<0.001**	**Fig. 2. F**
Interaction % urban distance	**distance**	**483.12**	**-3.876e-05**	**2.346e-05**	**0.09478**	**Fig. S4. B**
	% urban²		**-8.232e-04**	**2.168e-04**	**<0.001**	
	% urban		**9.036e-02**	**1.872e-02**	**<0.001**	
	% urban²:distance		**-1.327e-09**	**7.982e-09**	**0.86660**	

HEX [HEX]GCCTTGCCAGCCCGC, Tail_C_ATTO550 [ATTO550]CAGGACCAGGCTACCGTG, Tail_D_ATTO565 [ATTO565]CGGAGAGCCGAGAGGTG. The primer and tail correspondence are indicated in Appendix S2, Table 1. All three PCR mixes had a total volume of 12 µl with 1 × Master Mix Type-it microsatellite PCR kit (QIAGEN, 206246, Hilden, Germany) and 2 µl extracted DNA with 0.02 - 0.1 µM of primer forward, 0.04 - 0.2 µM of primer reverse, and 0.1 - 0.2 µM of tail. All PCRs were run with the same cycling program: 5 min, annealing at 95 °C, 36 cycles with denaturation (30 s) at 95 °C, annealing (3 min) at 60 °C, extension (30 s) at 72 °C, and a final 30 min extension at 60 °C. Electropherograms were read and interpreted with Genemarker 1.95 (Softgenetics, State College, PA, USA).

Genetic analyzes

Bayesian methods such as STRUCTURE (Pritchard & al. 2000) require data that conform to several conditions, in particular the Hardy-Weinberg equilibrium within a cluster, the sample-size equilibrium of clusters, and the allelic-diversity equilibrium between clusters (Puechmaille 2016). As basic population genetics (i.e., allelic richness, heterozygosities, F indices, null allele frequency) could not be computed before identification of species, none of these three conditions could be verified before clustering. Species identification was therefore made by using three methods concurrently: simple PCA, discriminant PCA (dACP, Jombart 2008, Jombart & al. 2010), and GENECLASS 2 (Piry & al. 2004). To assign species names to genotypic groups defined by microsatellite analysis, the original DNA of individuals ("reference individuals") that were subjected to both NUMOBAT and mtDNA identification in Seifert & al. (2017) was used. As our samples might have included individuals from distant clades such as *Tapinoma erraticum* and *Tapinoma simrothi* species groups, a two-step approach was used. All three methods were applied on all the individuals sampled, with an addition of 15 reference individuals per described species. Each detected species group separately was then reanalyzed, again with 15 reference individuals per described species. Identification results were subsequently used as priors in Bayesian analysis (STRUCTURE, Pritchard & al. 2000) for confirmation. The detailed identification methods and results can be found in Appendix S1 to 4, respectively.

Spatial analyses

Spatial analyses were based on 2015 landscape data from the OCS GE (Occupation du sol à Grande Echelle) Version 1.1 for Hérault and Gard departments from IGN (Institut National de l'Information Géographique et Forestière). The scale of use is 1:2500. OCS GE vector files have 14 land-cover classes and 17 land-use classes. Minimal polygon areas are 200 m² within built-up areas, 500 m² within urban zones, and 2500 m² outside urban zones.

In a 250 m radius buffer around each sampling site, the percentage of urbanization (% urban, comprising two land-cover classes: impervious built-up CS ("Couverture du sol" in French or land cover) 1.1.1.1 and impervious none built-up CS 1.1.1.2), the percentage of agricultural land-use (% agri, land-use class Agriculture US ("usage du sol" in French or land use) 1.1), and the percentage of natural areas (% natural, land-cover classes Forests CS 2.1.1 and Scrublands CS 2.1.2 were calculated; other classes in this category were not taken into account as they include anthropic land uses such as gardens, lawns, or crops). Water surfaces (CS 1.2.2) were subtracted from the analyses.

The distance to the coast (in meters) was also measured using the coastline and the "Join attributes by nearest" tool (QGIS Development Team 2019). The distance to the coast was used to represent a habitat and niche gradient, from sand-dunes to sedimentary agricultural plain to dry, forested hillsides. All analyses were performed using QGIS 3.10.6 (QGIS development Team 2019).

Statistical analyses

Normality distributions of the four landscape variables were tested using a Shapiro-Wilk-Test. As the data were non-normal, we measured the correlations between the four variables using a Spearman rank correlation test (Borcard & al. 2018). To study the probability of occurrence of the detected species as a function of explanatory variables, generalized linear models (GLMs) with binomial logistic error (also called logistic models) were used. These models are suitable for presence / absence data (Crawley 2009). The effect and shape of effects were tested for all three land-cover variables, for the distance to the coast, and for the interaction between % urban and distance to the coast (Tabs. 1 and 2). For land-cover variables, linear, quadratic (i.e., by combining parameter + parameter^2), and cubic models (parameter + parameter^2 + parameter^3) were tested. For all models, except for the distance to the coast one, a model selection protocol was followed using the Akaike Information Criteria (AIC). The best model selected was the one with the lowest AIC depending on the number of parameters studied (adding one parameter must decrease the AIC by two unities to improve the model). The AIC thus achieved the best compromise between data adjustment and model parsimony (Crawley 2009). For each model, the significance of the parameters was calculated using a type III Analysis of variance, adapted to logistic regressions (package "car"; Fox & Weisberg 2019). The display of the models was produced using the "effect" package (Fox & al. 2020). Different types of models (linear, quadratic, and cubic) were tested because along this gradient environmental parameters could show linear but also more complex responses, with thresholds and hump-shaped curves (McDonnell & Hahs 2008, Crawley 2009).

All statistical analyses were computed using R version 3.6.2 (R Development Core Team 2019), and R studio (R Studio Team 2020).

Results

Species occurrences

From the 926 sampling sites, individuals from 373 *Tapinoma* colonies were collected. DNA analyses identified 197 *Tapinoma nigerrimum* (21.27% of occurrences), 78 *Tapinoma darioi* (8.42%), 6 *Tapinoma magnum* (0.65%), 1 *Tapinoma ibericum* (0.11%) and 91 *Tapinoma madeirense* (9.83%). We did not detect any *Tapinoma* in the remaining 553 points (59.72%) (Fig. 1). As *T. magnum* and *T. ibericum* were uncommon and *T. madeirense* does not belong to the *T. nigerrimum* species group, they were not included in the statistical analyses.

Correlations between variables and study area description

All variables were weakly but significantly correlated (p-value < 0.001), except for the % urban versus % agri (correlation coefficient = -0.6) and % agri versus % natural (correlation coefficient = -0.5) which were highly correlated (Fig. S2.). The total buffers represent 29.56% natural areas, 21.73% urban areas, and 29.02% for agricultural use.

Effects of land cover and land use on the probability of occurrence for *Tapinoma nigerrimum* and *Tapinoma darioi*

Natural areas: Our study area comprised 35.24% natural areas that contained 9 *Tapinoma darioi*, 1 *Tapinoma magnum*, 65 *Tapinoma nigerrimum*, 21 *Tapinoma madeirense*, and 0 *Tapinoma ibericum* colonies. Natural areas had significant effects on the distribution of both species. For *T. nigerrimum*, GLMs showed a positive effect of % natural (Fig. 2A). Conversely, for *T. darioi*, GLMs showed a negative effect of % natural (Fig. 2B). The best models according to the AIC for % natural were the linear models (Tabs. 1 and 2).

Urban areas: Our study area comprised 13.30% urban areas containing 37 *Tapinoma darioi*, 1 *Tapinoma magnum*, 38 *Tapinoma nigerrimum*, 26 *Tapinoma madeirense* and 1 *Tapinoma ibericum* colonies. For *T. nigerrimum*, the best selected model (AIC = 890.79) was the cubic model (Tab. 1; Fig. 2C). The probability of occurrence of *T. nigerrimum* was very high (0.5 to 0.1) from 0 to 20% of % urban followed by a plateau (probabilities between 0.1 and 0.15) from 20 to 70% of % urban. Above 70%, the probabilities dropped to 0.

For *Tapinoma darioi*, the best model according to AIC was the quadratic effect of % urban on the probability of occurrence (Tab. 2; Fig. 2D). The probabilities of occurrences were maximized around 75% of % urban, and dropped below 0.05 below 20% and above 95% of % urban (Tab. 2; Fig. 2D).

Agricultural land use: Our study area comprised 30.31% agricultural use areas containing 7 *Tapinoma darioi*, 0 *Tapinoma magnum*, 58 *Tapinoma nigerrimum*, 23 *Tapinoma madeirense* and 0 *Tapinoma ibericum* colonies.

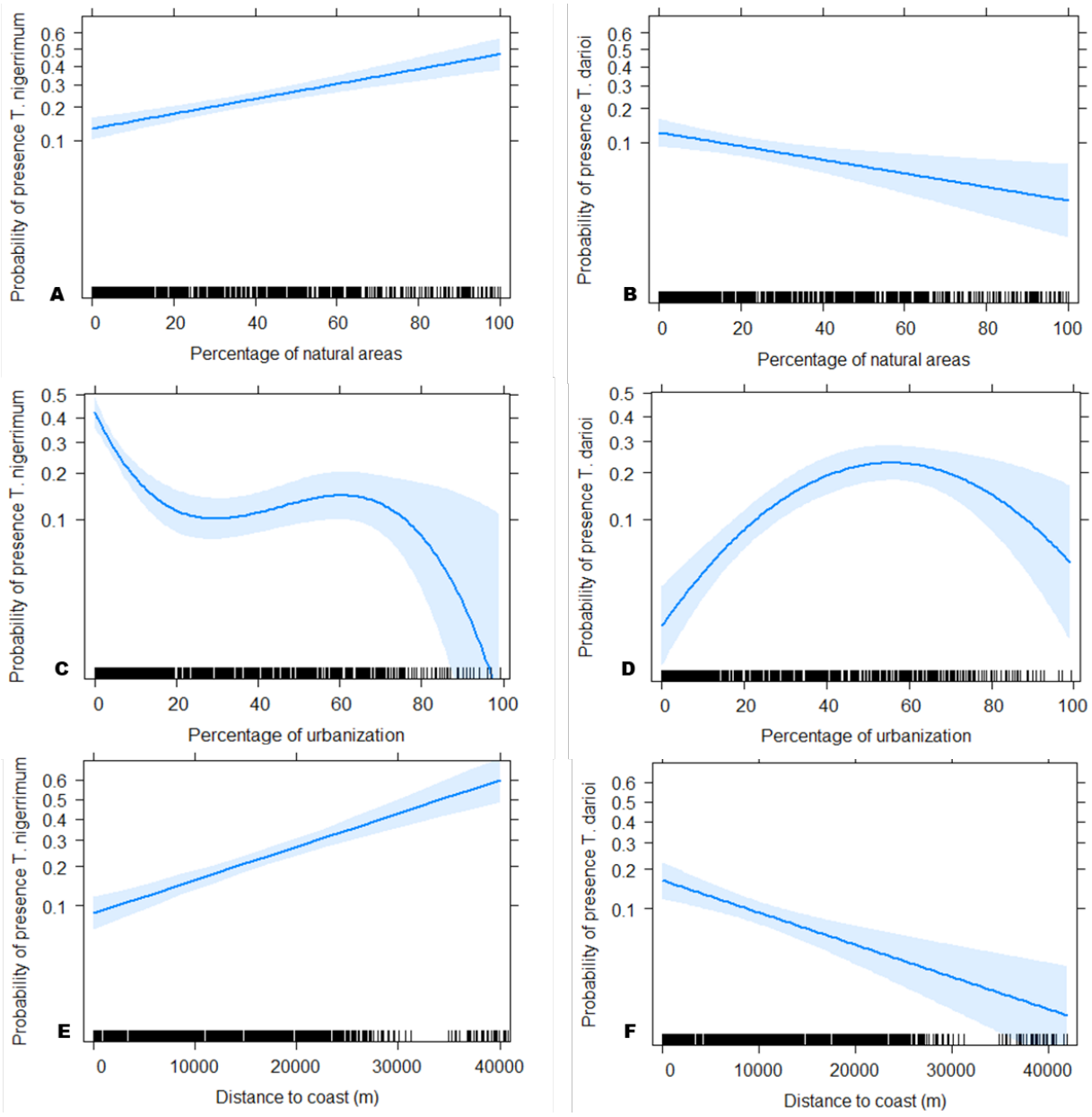


Fig. 2: Probabilities of occurrence for (A) *Tapinoma nigerrimum* (linear model, p-value < 0.001) and (B) *Tapinoma darioi* (linear model, p-value < 0.001) as a function of percentage of natural landscapes in a 250 m radius circular buffer around sampling sites (% natural). Probabilities of occurrence for (C) *Tapinoma nigerrimum*, (cubic model, p-value < 0.001) and (D) *T. darioi*, (quadratic model, p-value < 0.001), as a function of percentage of urban landscapes in a 250 m radius circular buffer around sampling sites (% urban). Probabilities of occurrence for (E) *T. nigerrimum* and (F) *T. darioi* as a function of the distance to the coast in meters with a p-value < 0.001. The light blue area represents the standard error. The rug plot at the bottom of the graph shows the number of sampling points corresponding to % urban values.

For *Tapinoma nigerrimum*, the best selected model was the quadratic model (Tab. 1; Fig. S3A). The probability of occurrence of *T. nigerrimum* was maximized at around 50% of % agri at 0.3 and dropped below 0.15 below 30% and above 80% of % agri (Tab. 1; Fig. S3A).

For *Tapinoma darioi*, GLMs showed a negative effect of % agri (Fig. S3B). The best model according to the AIC for % agri was the linear model (Tab. 2).

Distance to coast: The probability of occurrence of *Tapinoma nigerrimum* was positively and linearly correlated with the distance to the coast (Tab. 1; Fig. 2E). Conversely, the probability of occurrence of *Tapinoma darioi* decreased linearly as we moved away from the coast (Tab. 2; Fig. 2F).

Interactions between distance to the coast and portion of urban land use:

For *Tapinoma nigerrimum*, the best model was the interaction (Tab. 1; Fig. S4A), with the probability of occurrence higher in urbanized areas close to the coast, decreasing

as we moved away from the coast. The best model was the interaction model also for *Tapinoma darioi* (Tab. 2). However, the interaction was not significant (Tab. 2). As shown in Figure S4B, the same response to % urban was observed independently of the distance to the coast: The probability of occurrence of *T. darioi* peaks at 60% of % urban whatever the distance to the coast. However, far from the coast, the probabilities for *T. darioi* decreased to < 0.05 at low values of % urban, while near the coast, this decrease was less pronounced at 0.12 but the standard error was larger (Fig. S4B).

Discussion

Species occurrence in the *Tapinoma nigerrimum* complex

Tapinoma nigerrimum was found in 21% of the sampled points, making it the most frequently observed species of the complex, far beyond *Tapinoma darioi* (8%), *Tapinoma magnum* (1%), and *Tapinoma ibericum* (1 site). Indeed, it is considered a fairly common species in Southern France (Blatrix & al. 2013), described in 1856 on the basis of specimens from the surroundings of Montpellier, although it may have been confused with other species of the complex (Seifert & al. 2017). It can also be noted that *Tapinoma* supercolonies (*magnum* or *darioi*) were observed in Valras-Plage (15 km South-East of sampling zone) and Port-Leucate (120 km South-East) in 1991 (B. Kaufmann, unpubl.).

Our results are comparable with those obtained by Gippet & al. (2017) in the urban area of Lyon for the genus *Lasius* Fabricius, 1804, where native species are much more common than the invasive *Lasius neglectus*. Interestingly, the relative rarity of *Tapinoma magnum* in the urban area of Montpellier was not expected because Seifert & al. (2017) had observed this species along the coast nearly as often as *Tapinoma darioi*. Further studies would allow us to understand the causes of this difference, such as inspecting museum collections to determine the date of introduction, studying how the two species are introduced and dispersed in the region to determine the routes of invasion and vectors, and conducting competition experiments in the field or in the laboratory. *Tapinoma ibericum* was only observed once, which is consistent with the observations of Seifert & al. (2017), who only reported one single invaded site outside the Iberian Peninsula, on the Isle of Wight.

Distinct spatial patterns between non-invasive and invasive species

Neither *Tapinoma nigerrimum* nor *Tapinoma darioi* showed a linear response to urbanization. While *T. nigerrimum* was mainly observed in natural areas on limestone plateaus and hills mostly covered with Mediterranean forests, the tramp species *T. darioi* peaked at intermediate levels of urbanization. These results support our hypothesis of a positive relation between urbanization and the occurrence of species that exhibit traits common in invasive ants. These results are also consistent with Seifert & al. (2017), who suggested that *T. darioi* is more abundant in sites impacted by human activities, whereas *T. nigerrimum* prefers natural and semi-natural habitats.

Three non-exclusive hypotheses can be proposed to explain these distinct distributions. First, the observed distribution may result from the historical presence of both species in the area before the expansion of the city of Montpellier. *Tapinoma darioi* is commonly found in open sandy habitats along the coast and might have persisted despite urbanization. Second, like most invasive species, *T. darioi* could have been introduced and spread in urban areas where most native species usually disappear (Cadotte & al. 2017). While for *Tapinoma nigerrimum* most new founding queens probably disperse on the wing, in *T. darioi*, it is more likely that passive human-mediated dispersal occurs (Seifert & al. 2017). As has been shown in fire ants (King & al. 2009) or in Argentine ants (Suarez & al. 2001), dispersal of ants occurs at medium and long distances through the transport of soil containing colony fragments with adult or larval queens (e.g., Suhr & al. 2019). Gippet & al. (2017) found that *Lasius neglectus* was detected at significantly higher probabilities in major road embankments, which was interpreted as the impact of landscaping generating important transportation of soil.

Moreover, intermediate levels of urbanization corresponding to the green suburbs of the largest cities, as well as in urban parks and tourist towns close to the coast, offer a heterogeneous environment (McKinney 2006, Cadenasso & al. 2007, Clergeau 2007). This environment could provide habitat patches for invasive species such as *Tapinoma darioi*, while filtering against ecological traits exhibited by *Tapinoma nigerrimum*. *Tapinoma nigerrimum* does not have the characteristics of a tramp species (Passera 1994): monodomous (only one nest per colony, and colonies behave aggressively to one another; Seifert & al. 2017). Its social system is therefore similar to *Lasius niger* and *Tetramorium immigrans*, which are the most urban tolerant species in most of Europe. As it builds 20 - 40 cm high large dome-shaped nests in open areas, it might be negatively affected by constant mowing and soil compaction found in urban greenspaces, which may explain this absence. Conversely, *T. darioi*'s supercolonial organization, where many interconnected nests make up the whole of the colony, can facilitate the access to numerous nesting sites in the heterogeneous suburban landscape, where parts of the colony can concentrate depending on the season and available resources, as has been observed in the Argentine ant as well as in *Tapinoma sessile* (Heller & Gordon 2006, Menke & al. 2010).

The rarity of *Tapinoma darioi* in dense city centers might be explained by the absence of both suitable nesting sites and food resources. It is also possible that *T. darioi* has established itself in disturbed habitats with less interspecific competition (Cadotte & al. 2017). Indeed, potential competitors such as *Tetramorium immigrans* Santschi, 1927, *Lasius niger* (Linnaeus, 1758), or *Pheidole pallidula* (Nylander, 1849) are present in denser parts of the urban gradient (Madre & al. 2013). Unfortu-

nately, as stated above, it is impossible to know whether *T. darioi* was already present before the expansion of the city, making the current distribution of the *Tapinoma nigerrimum* species complex difficult to explain.

Third, dense urban areas are characterized by urban heat islands, where heat-radiating buildings and canyon effects impose a steep, rising temperature gradient from rural areas to city centers, with the effect being stronger in larger cities. *Tapinoma darioi* could be better adapted to the higher temperatures of urban areas or in the middle of dunes close to the coast compared with *Tapinoma nigerrimum*. Indeed, even closely related ant species may differ in their thermal tolerance (e.g., Cerdá & al. 1998). Moreover, Angilletta & al. (2007) showed that ectotherms such as ants in urban areas are more heat tolerant than those in rural areas. Bujan & al. (2021) have recently shown that *Tapinoma magnum* can shift its thermal niche, a capacity for thermal plasticity that *T. darioi* might also possess.

Conclusion

We used microsatellites to confirm species identities in the *Tapinoma nigerrimum* species complex to improve our knowledge of the occurrence and distribution of species in this complex in Southern France. Biodiversity does not only provide services, and this must be taken into account in the management of cities. As other invasive ants have been shown to decrease local ant and soil arthropod diversity (e.g., *Lasius neglectus*; see Nagy & al. 2009), further research should examine the ecological consequences of *Tapinoma darioi* and *T. nigerrimum* on the richness and abundance of the local arthropod and plant communities.

Acknowledgements

We thank Bernhard Seifert and Massimiliano Centorame for providing part of the reference individuals from Seifert & al. (2017) which were used in this study. We thank Annick Lucas for her collaboration and her availability. We also thank all collaborators who actively participated in the collecting of *Tapinoma* ants and more specifically Yannick Juvé, Célian Diblasi, Pierre-Louis Duarte, Célia Lecomte, Ambre Mautuit, Corentin Sagnet, and Julien Tchilingrian. We also thank Cyril Bernard, assistant engineer at the CNRS, for his advice given on QGIS. We are grateful for the funding provided by Doctoral School 60, CNRS-PEPS, as well as the LABEX IMU (ANR-10-LABX-0088) of Université de Lyon.

References

Angilletta, M.J., Wilson, R.S., Niehaus, A.C., Sears, M.W., Navas, C.A. & Ribeiro, P.L. 2007: Urban physiology: city ants possess high heat tolerance. – Public Library of Science One 2: art. e258.

Berville, L., Hefetz, A., Espadaler, X., Lenoir, A., Renucci, M., Blight, O. & Provost, E. 2013: Differentiation of the ant genus *Tapinoma* (Hymenoptera: Formicidae) from the Mediterranean Basin by species-specific cuticular hydrocarbon profiles. – Myrmecological News 18: 77-92.

Blacket, M.J., Robin, C., Good, R.T., Lee, S.F. & Miller, A.D. 2012: Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments – an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. – Molecular Ecology Resources 12: 456-463.

Blatrix, R., Galkowski, C., Lebas, C. & Wegnez, P. 2013: Fourmis de France, de Belgique et du Luxembourg. – Luçon, Delachaux et Niestlé, 288 pp.

Blight, O., Provost, E., Renucci, M., Tirard, A. & Orgeas, J. 2010: A native ant armed to limit the spread of the Argentine ant. – Biological Invasions 12: 3785-3793.

Borcard, D., Gillet, F. & Legendre, P. 2018: Numerical Ecology with R. Springer, Cham, pp. 299-367.

Bornand, M., Robbez-masson, J.-M., Donnet, A. & Lacaze, B. 1997: Caractérisation des sols et paysages des garrigues méditerranéennes. Typologie et extrapolation spatiales par traitement d'images satellitaires. – Etude et Gestion des Sols 4: 27-42.

Bujan, J., Charavel, E., Bates, O.K., Gippet, J.M.W., Darras, H., Lebas, C. & Bertelsmeier, C. 2021: Increased acclimation ability accompanies a thermal niche shift of a recent invasion. – Journal of Animal Ecology 90: 483-491.

Cadenasso, M.L., Pickett, S.T.A. & Schwarz, K. 2007: Spatial heterogeneity in urban ecosystems: reconceptualizing land cover and a framework for classification. – Frontiers in Ecology and the Environment 5: 80-88.

Cadotte, M.W., Yasui, S.L.E., Livingstone, S. & MacIvor, J.S. 2017: Are urban systems beneficial, detrimental, or indifferent for biological invasion? – Biological Invasions 19: 3489-3503.

Cerdà, X., Retana, J. & Manzaneda, A. 1998: The role of competition by dominants and temperature in the foraging of subordinate species in Mediterranean ant communities. – Oecologia 117: 404-412.

Clergeau, P. 2007: Une écologie du paysage urbain. – Edition Apogée, Rennes, 144 pp.

Cordonnier, M., Bellec, A., Dumet, A., Escarguel, G. & Kaufmann, B. 2018: Range limits in sympatric cryptic species: a case study in *Tetramorium* pavement ants (Hymenoptera: Formicidae) across a biogeographical boundary. – Insect Conservation and Diversity 12: 109-120.

Cordonnier, M., Gibert, C., Bellec, A., Kaufmann, B. & Escarguel, G. 2019: Multi-scale impacts of urbanization on species distribution within the genus *Tetramorium*. – Landscape Ecology 34: 1937-1948.

Crawley, M.J. 2009: The R Book. – Wiley-Blackwell, Chicago, IL, 942 pp.

Dekoninck, W., Parmentier, T. & Seifert, B. 2015: First records of a supercolonial species of the *Tapinoma nigerrimum* complex in Belgium (Hymenoptera: Formicidae). – Bulletin de la Société royale belge d'Entomologie 151: 206-209.

Direction Départementale des Territoires et de la Mer de l'Hérault 2016: [no name of website given] <https://www.herault.gouv.fr/Services-de-l-Etat/Agriculture-environnement-amenagement-et-logement/Direction-Departementale-des-Territoires-et-de-la-Mer-de-l-Herault-DDTM-34>, retrieved on 2 May 2021.

Fox, J. & Weisberg, S. 2019: An R companion to applied regression, 3rd edn. – Sage, Thousand Oaks, CA, 607 pp.

Fox, J., Weisberg, S., Friendly, M., Hong, J., Anderson, T., Firth, D., Taylor, S. & the R Core Team 2020: Package "effects" – Effect Displays for Linear, Generalized Linear, and Other Models.

Gippet, J.M.W., Mondy, N., Diallo-Dudek, J., Bellec, A., Dumet, A., Mistler, L. & Kaufmann, B. 2017: I'm not like everybody else: Urbanization factors shaping spatial distribution of native and invasive ants are species-specific. – Urban Ecosystems 20: 157-169.

Hale, J.D., Fairbrass, A.J., Matthews, T.J. & Sadler, J.P. 2012: Habitat composition and connectivity predicts bat presence and activity at foraging sites in a large UK conurbation. – Public Library of Science One 7: art. e33300.

Heller, N.E. & Gordon, D.M. 2006: Seasonal spatial dynamics and causes of nest movement in colonies of the invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). – Ecological Entomology 31: 499-510.

Heterick, B.E., Lythe, M. & Smithyman, C. 2013: Urbanisation factors impacting on ant (Hymenoptera: Formicidae) biodiversity in the Perth metropolitan area, Western Australia: two case studies. – Urban Ecosystems 16: 145-173.

Holway, D.A., Lach, L., Suarez, A.V., Tsutsui, N.D. & Case, T.J. 2002: The causes and consequences of ant invasions. – Annual Review of Ecology and Systematics 33: 181-233.

INSEE 2017: [no name of website available] – <https://www.insee.fr/fr/information/2016807>, retrieved on 10 May 2021.

INSEE 2018: [no name of website available] – <https://www.insee.fr/fr/information/2016807>, retrieved on 6 May 2021.

INSEE 2020: [no name of website available] – <www.insee.fr/fr/statistiques/2011101?geo=AU2010-015>, retrieved on 5 May 2021.

Jombart, T. 2008: Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. – Bioinformatics 24: 1403-1405.

Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. 2010: Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. – BioMed Central Genetics 11: art. 94.

King, J.R., Tschinkel, W.R. & Ross, K.G. 2009: A case study of human exacerbation of the invasive species problem: transport and establishment of polygyne fire ants in Tallahassee, Florida, USA. – Biological Invasions 11: 373-377.

Klarica, J., Bittner, L., Pallua, J., Pezzei, C., Huck-Pezzei, V., Dowell, F., Schied, J., Bonn, G.K., Huck, C., Schlick-Steiner, B.C. & Steiner, F.M. 2011: Near-Infrared Imaging Spectroscopy as a tool to discriminate two cryptic *Tetramorium* ant species. – Journal of Chemical Ecology 37: 549-552.

Leroux, M. 2001: Les climats subtropicaux dits «méditerranéens» et les climats de la Méditerranée (1re partie). – L'information géographique 65: 304-320.

Lintott, P.R., Barlow, K., Bunnefeld, N., Briggs, P., Roig, C.G. & Park, K.J. 2016: Differential responses of cryptic bat species to the urban landscape. – Ecology and Evolution 6: 2044-2052.

Madre, F., Vergnes, A., Machon, N. & Clergeau, P. 2013: A comparison of 3 types of green roof as habitats for arthropods. – Ecological Engineering 57: 109-117.

Malausa, T., Gilles, A., Meglécz, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Castagnone-Sereno, P., Délye, C., Feau, N., Frey, P., Gauthier, P., Guillemaud, T., Hazard, L., Le Corre, V., Lung-Escarmant, B., Malé, P.J.G., Ferreira, S. & Martin, J.F. 2011: High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. – Molecular Ecology Resources 11: 638-644.

McDonnell, M.J. & Hahs, A.K. 2008: The use of gradient analysis studies in advancing our understanding of the ecology of urbanizing landscapes: current status and future directions. – Landscape Ecology 23: 1143-1155.

McKinney, M.L. 2002: Urbanization, biodiversity, and conservation. The impacts of urbanization on native species are poorly studied, but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. – BioScience 52: 883-890.

McKinney, M.L. 2006: Urbanization as a major cause of biotic homogenization. – Biological Conservation 127: 247-260.

Menke, S.B., Booth, W., Dunn, R.R., Schal, C., Vargo, E.L. & Silverman, J. 2010: Is it easy to be urban? Convergent success in urban habitats among lineages of a widespread native ant. – Public Library of Science One 5: art. e9194.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000: Biodiversity hotspots for conservation priorities. – Nature 403: 853-858.

Nagy, C., Tartally, A., Vilisics, F., Merkl, O., Szita, E., Szél, G., Podlussány, A., Rédei, D., Csősz, S., Pozsgai, G., Orosz, A., Szövényi, G. & Markó, V. 2009: Effects of the invasive garden ant, *Lasius neglectus* Van Loon, Boomsma & Andrásfalvy, 1990 (Hymenoptera: Formicidae), on arthropod assemblages: pattern analyses in the type supercolony. – Myrmecological News 12: 171-181.

Padayachee, A.L., Irlich, U.M., Faulkner, K.T., Gaertner, M., Procheş, Ş., Wilson, J.R.U. & Rouget, M. 2017: How do invasive species travel to and through urban environments? – Biological Invasions 19: 3557-3570.

Passera, L. 1994: Characteristics of tramp species. In: Williams D.F. (Ed.): Exotic Ants: Biology, impact, and control of introduced species. – Westview Press, Boulder, CO, USA, pp. 23-43.

Pickett, S.T.A. & Cadenasso, M.L. 2007: Linking ecological and built components of urban mosaics: an open cycle of ecological design. – Journal of Ecology 96: 8-12.

Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.M., Paetkau, D., Baudouin, L. & Estoup, A. 2004: GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. – Journal of Heredity 95: 536-539.

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. – Genetics 155: 945-959.

Puechmaille, S.J. 2016: The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. – Molecular Ecology Resources 16: 608-627.

QGIS Development Team 2019: QGIS, a free and open source geographic information system. Version 3.10.6. – <https://www.qgis.org/fr/site/>, retrieved on 18 November 2021.

R Development Core Team 2019: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – <http://www.r-project.org/index.html>, retrieved on 12 May 202.

RStudio Team 2020: RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. – <http://www.rstudio.com/>, retrieved on 22 November 2020.

Seifert, B., D'Eustacchio, D., Kaufmann, B., Centorame, M., Lorite, P. & Modica, M.V. 2017: Four species within the supercolonial ants of the *Tapinoma nigerrimum* complex revealed by integrative taxonomy (Hymenoptera: Formicidae). – Myrmecological News 24: 123-144.

Suarez, A.V., Holway, D.A. & Case, T.J. 2001: Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: insights from argentine ants. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 1095-1100.

Suhr, E.L., O'Dowd, D.J., Suarez, A.V., Cassey, P., Wittmann, T.A., Ross, J.V. & Cope, R.C. 2019: Ant interceptions reveal roles of transport and commodity in identifying biosecurity risk pathways into Australia. – NeoBiota 53: 1-24.

Valéry, L., Fritz, H., Lefeuvre, J.C. & Simberloff, D. 2008: In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. – Biological Invasions 10: 1345-1351.

Valéry, L., Fritz, H., Lefeuvre, J.C. & Simberloff, D. 2009: Invasive species can also be native ... – Trends in Ecology & Evolution 24: 585.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J. & Melillo, J.M. 1997: Human domination of Earth's ecosystems. – Science 277: 494-499.

Myrmecological News

myrmecologicalnews.org

Myrmecol. News 32

Digital supplementary material

Digital supplementary material to

CENTANNI, J., KAUFMANN, B., BLATRIX, R., BLIGHT, O., DUMET, A., JAY-ROBERT, P. & VERGNES, A. 2022: High resolution mapping in Southern France reveals that distributions of supercolonial and monodomous species in the *Tapinoma nigerrimum* complex (Hymenoptera: Formicidae) are related to sensitivity to urbanization. – Myrmecological News 32: 41-50.

The content of this digital supplementary material was subject to the same scientific editorial processing as the article it accompanies. However, the authors are responsible for copyediting and layout.

Fig. S1: Square grid mesh of 1km² on the study area.

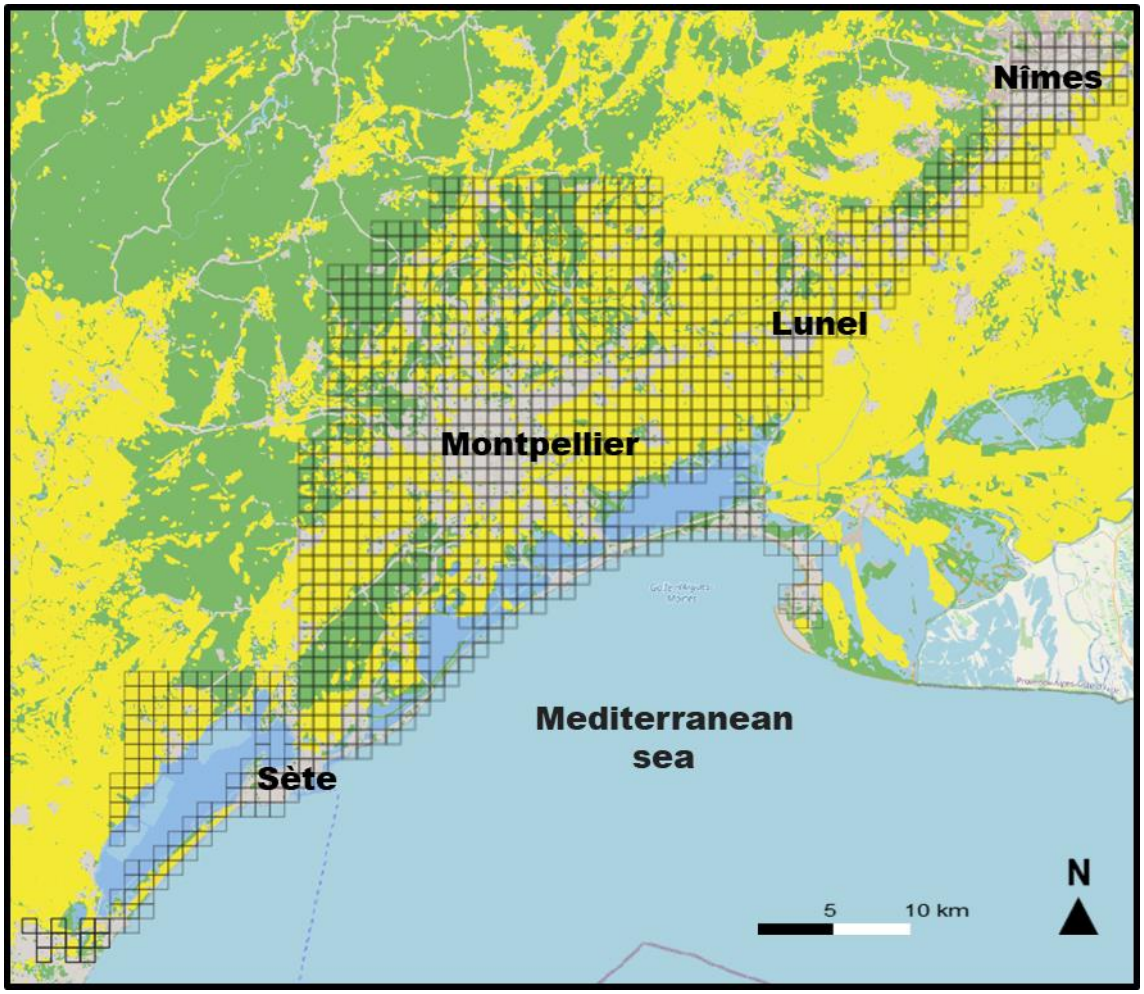


Fig. S2: Correlogram between the variables studied: “percentage of agricultural areas”, “percentage of urbanization”, “percentage of natural areas”, and the variable distance to the coast. The key in red corresponds to a negative correlation and the key in blue corresponds to a positive correlation according to the Spearman correlation test.

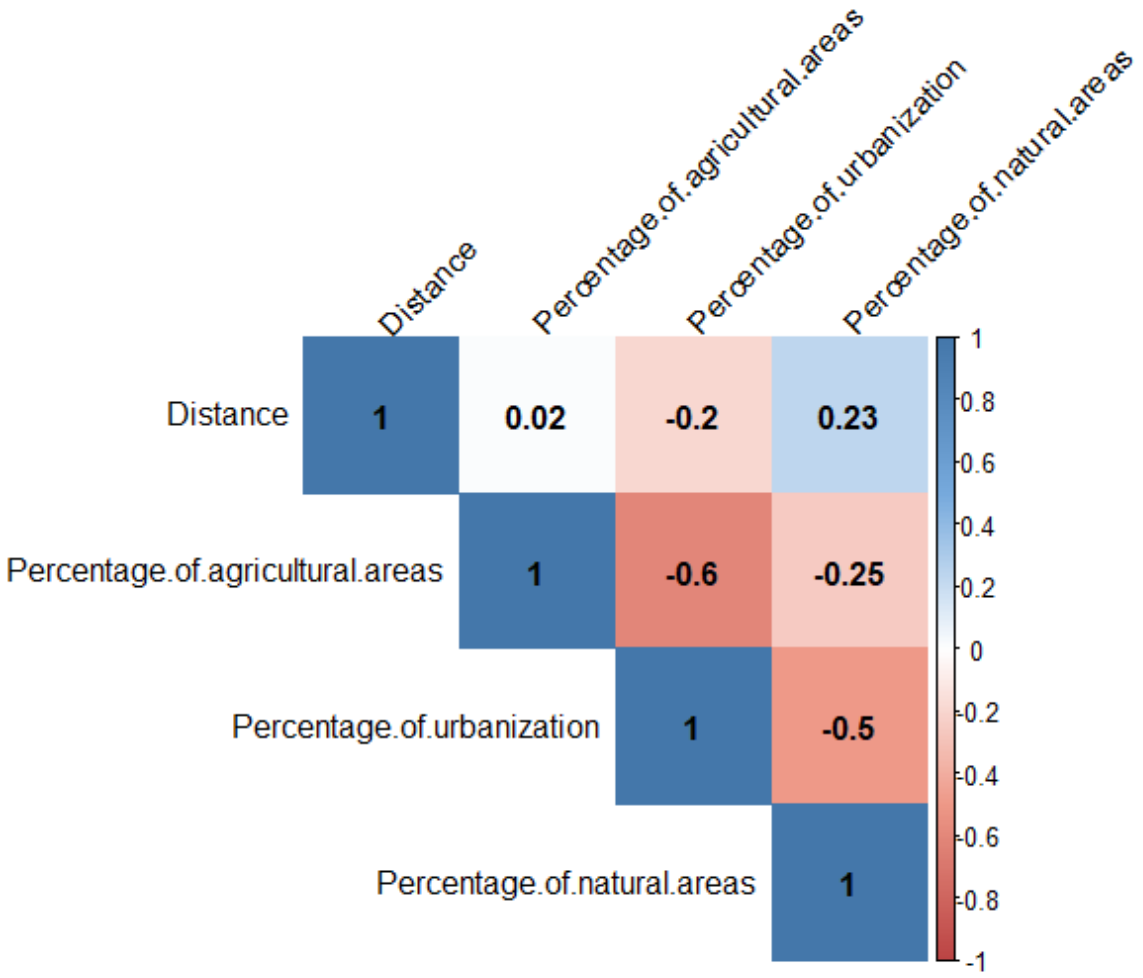


Fig. S3: Probabilities of occurrence for (A) *T. nigerrimum* (quadratic model, pvalue <0.001) and (B) *T. darioi* (linear model, pvalue <0.001), as a function of percentage of area for agricultural use in a 250m radius circular buffer around sampling sites (% agri). The light blue area represents the standard error. The rug plot at the bottom of the graph shows the number of sampling points corresponding to % agri values.

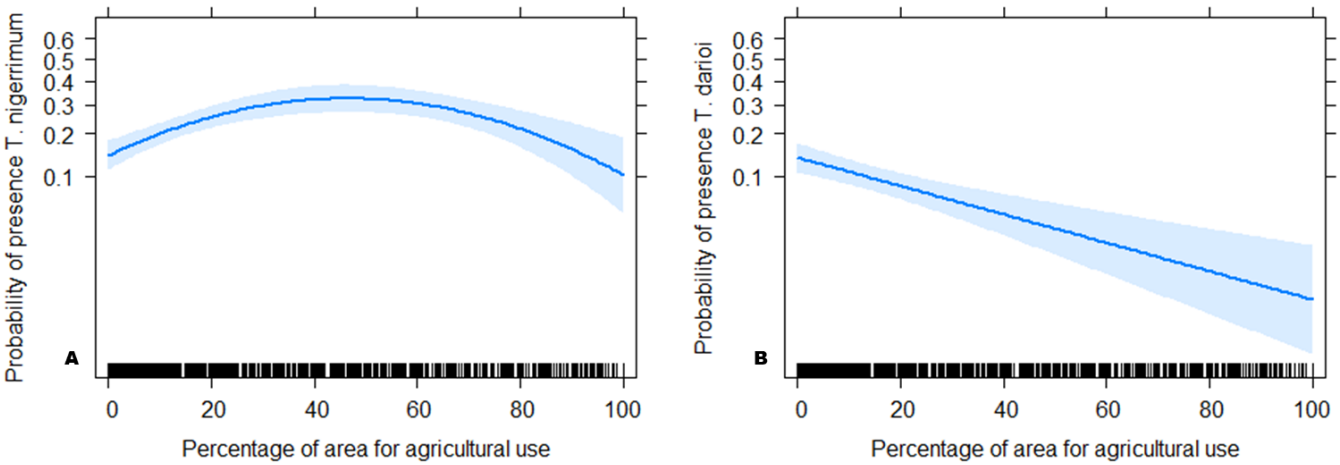
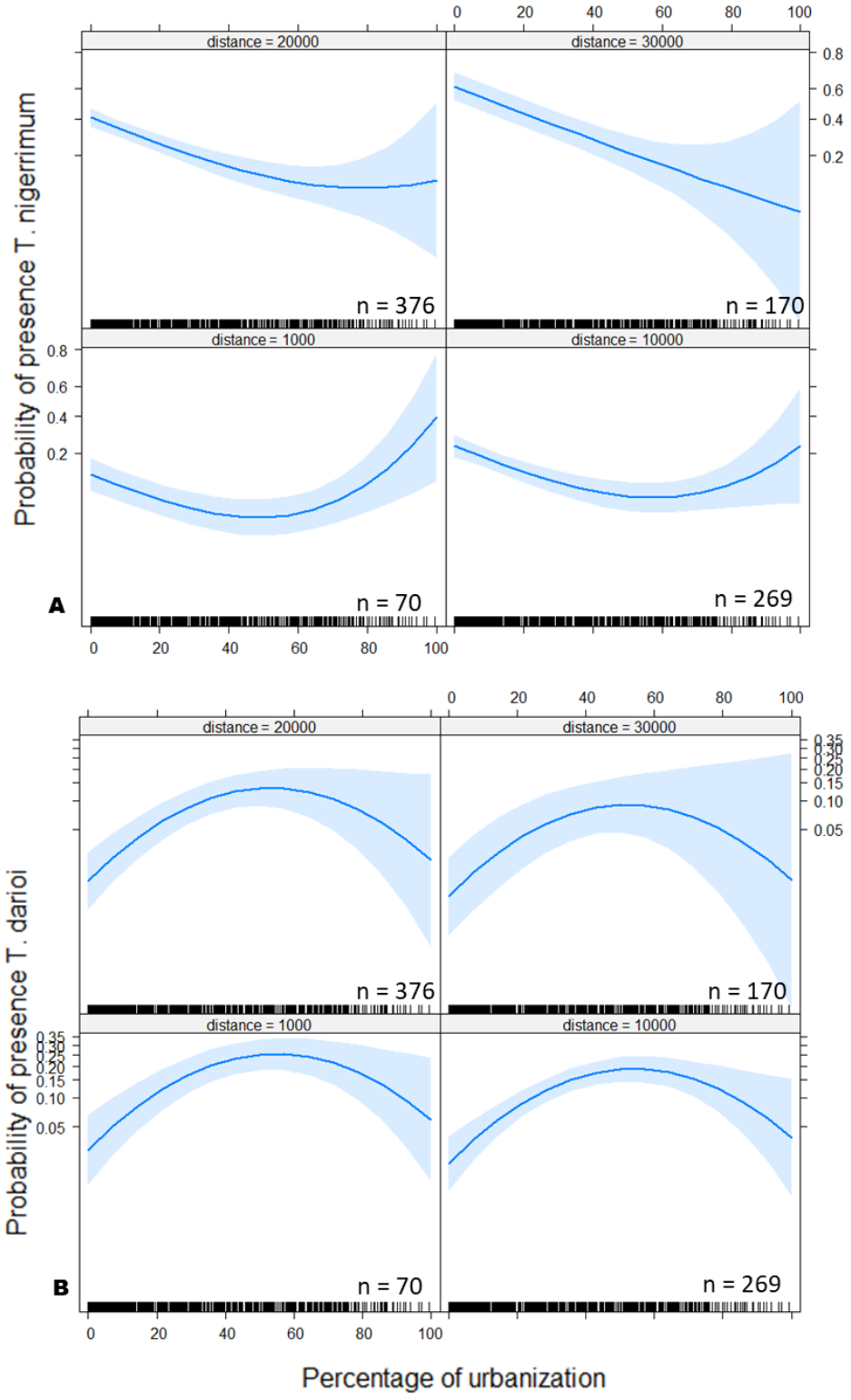


Fig. S4: Probabilities of occurrence for (A) *T. nigerrimum* (pvalue <0.01) and (B) *T. darioi*, (pvalue = 0.87) according to the interaction of urbanization and distance to the coast. The light blue area represents the standard error. n: number of points per class. The rug plot at the bottom of the graph shows the number of sampling points corresponding to % urban values. The direction in which the graphics are read begins at the bottom, from left to right and then at the top from left to right.



Appendix S1. Genetic identification by microsatellites

Three other Appendix files are available:

- *Appendix S2.docx*, characteristics of microsatellite markers
- *Appendix S3.xlsx*, genotypes, geographic coordinates, PCA, DAPC and GC2 result table, is available as a separate file from the journal's web pages.
- *Appendix S4.docx*, PCA, DAPC and STRUCTURE figures.

SEIFERT & al. (2017) used NUMOBAT morphological methods to define species within the *Tapinoma nigerrimum* species complex and to identify individuals to the species level. They also used mitochondrial DNA (Cytochrome Oxidase gene) sequencing, which supported the NUMOBAT taxonomy. However, a number of disagreements between NUMOBAT and mtDNA appeared in *T. magnum* and *T. darioi* from Italy and from France. The identification of workers (but not of males) by NUMOBAT also led to some ambivalent results in *T. darioi* and *T. magnum*.

NUMOBAT identification methods are extremely time consuming (KLARICA & al. 2011) and mtDNA markers do not give exact identifications in species complexes where hybridization or incomplete lineage sorting occur (as is the case in *T. nigerrimum* complex, SEIFERT & al. 2017). Following the methods developed in CORDONNIER & al. (2019), we therefore used 15 microsatellite markers designed for *Tapinoma magnum* to genotype one individual per colony collected. The details for microsatellite development, sequences and primers can be found in Appendix S1. The rationale behind identification by genotyping is that mutations that accumulate in microsatellite sequences should result in strong differentiation over time, especially in species which are reproductively isolated. Microsatellites are, however, known to converge by homoplasy. To overcome this obstacle, several markers have to be analyzed together. In CORDONNIER & al. (2019), five species of the ant genus *Tetramorium* (MAYR, 1855) were identified with 17 highly polymorphic microsatellite markers, which also revealed numerous interspecific hybrids between two species (CORDONNIER & al. 2018). In the present paper, the same approach was used, with one major difference: we used the DNA of individuals that were subjected to both NUMOBAT and to mtDNA identification in SEIFERT & al. (2017) to assign species names to genotype groups defined by microsatellite analysis.

Microsatellite development

Fifteen markers were developed from *Tapinoma magnum* individuals: The total genomic DNA was isolated from the ants collected in Lyon in 2014. The DNA was extracted following crushing (3 min at 30Hz in a Retsch MM200 ball mill), standard digestion (proteinase K [75 µg] + 200 µl of TNES buffer [0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.5% SDS]) and salt-chloroform purification. The total genomic DNA was sent to GenoScreen, Lille, France (www.genoscreen.fr), where 1µg was used for the development of microsatellite libraries through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries as described in MALAUSA & al. (2011). The total DNA was mechanically fragmented and enriched for AG,

AC, AAC, AAG, AGG, ACG, ACAT and ATCT repeated patterns. The enriched fragments were subsequently amplified. The PCR products were purified, quantified and the GsFLX libraries were then carried out following the manufacturer's protocols and sequenced on a GsFLX PTP. Details for microsatellite development, sequences and primers can be found in Appendix S1. Primer characteristics and marker accession numbers can be found in Appendix S2 Table 1.

DNA extraction

The DNA from one individual per colony collected in the field was extracted by grinding each ant in proteinase K (10µL at 15mg/ml) and adding Chelex 7% (150µL), followed by a 2-hour incubation at 55°C and an additional 15 min at 90°C to inactivate the proteinase K.

Genotyping

Fifteen microsatellite markers were organized into three genotyping mixes (Appendix S2 Table 1) and run through a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) by a service provider (GENTYANE, Clermont-Ferrand).

Forward primers were end-labelled with universal tails following BLACKET & al. (2012); four different tails were used with the following fluorescent dyes - Tail_A_6FAM [6FAM]GCCTCCCTCGCGCCA, Tail_B_HEX [HEX]GCCTTGCCAGCCCGC, Tail_C_ATTO550 [ATTO550]CAGGACCAGGCTACCGTG, Tail_D_ATTO565 [ATTO565]CGGAGAGCCGAGAGGTG. The primer and tail correspondence are indicated in Appendix S2 Table 1. All three PCR mixes had a total volume of 12 µl with 1X Master Mix Type-it microsatellite PCR kit (QIAGEN, 206246) and 2 µl extracted DNA with 0.02-0.1 µM of primer Forward, 0.04-0.2 µM of primer reverse and 0.1-0.2 µM of tail. All PCRs were run with the same cycling program: 5 min. annealing at 95°C, 36 cycles with denaturation (30 s) at 95°C, annealing (3 min) at 60°C, extension (30 s) at 72°C, and a final 30 min extension at 60°C. Electrophoregrams were read and interpreted with Genemarker 1.95 (Softgenetics).

Genetic analyzes

Powerful Bayesian methods such as STRUCTURE (PRITCHARD & al. 2000) require data that conform to several conditions, in particular the Hardy-Weinberg equilibrium within a cluster, the sample size equilibrium of clusters and the allelic diversity equilibrium between clusters (PUECHMAILLE 2016). As basic population genetics (i.e. allelic richness, heterozygosities, F indices, null allele frequency) could not be computed before identification of species, none of these three conditions could be verified before clustering. Species identification was therefore made by using three methods concurrently: simple PCA, discriminant PCA (dACP, JOMBART 2008, JOMBART & al. 2010) and GENECLASS 2 (PIRY & al. 2004) which is based on Monte-Carlo resampling algorithms. We then checked the consensus results using STRUCTURE with or without priors.

In addition to samples belonging to the *Tapinoma nigerrimum* species complex, our samples might also include individuals from distant clades such as the *T. erraticum* and *T. simrothi* species groups. The *T. erraticum* species group is comprised of three species in France: *T. erraticum*, *T. madeirense* and *T. subboreale*. The precise taxonomy of *T. simrothi* is not stable, with a possible subspecies (*T. simrothi phoenicaeum*) found in the Western

Mediterranean, and disjoint distribution in Spain, Italy and North-Africa hinting at further complexity (www.antmaps.com). No *T. simrothi* colony has recently been found in France, but older records exist which makes its presence possible.

Species from the three groups cannot always be told apart in the field or identified reliably in the laboratory without using NUMOBAT methods.

We therefore built up a reference dataset from the colonies that were identified using NUMOBAT by B. Seifert, most of which were part of SEIFERT & al. (2017). For *Tapinoma madeirense* where too few NUMOBAT colonies were available, we used samples identified by mtDNA sequencing in another study. 9-16 individuals per species made up the reference dataset (Appendix S2 Table 3), except for the *T. simrothi* group, which might comprise more than one species, and where we chose to use 44 individuals that cover the geographical distribution of the species group. Individuals sampled for the present study constitute the test dataset, except for four samples which are part of the reference dataset because they were first identified by mtDNA sequencing and NUMOBAT by B. Seifert.

PCA and DAPC were run in the R package *adegenet* (JOMBART & al. 2008) with reference and test datasets simultaneously. For PCA, we manually grouped samples that formed coherent clusters. Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) is a multivariate method designed to identify clusters of genetically related individuals (JOMBART & al. 2010). It uses sequential K-means and model selection to infer genetic clusters. Probabilities of assignment to each cluster is computed for all samples. In both methods, we used the reference dataset to identify the species contained in each cluster. In DAPC, individuals within a species can be split between separate clusters if there is a strong structure within the species, which can also occur with Bayesian methods such as STRUCTURE (e.g. CORDONNIER & al. 2019). The probability of assignment to species is therefore computed by addition of the probabilities into clusters belonging to the same species, which are identified thanks to the reference dataset.

Geneclass2 (GC2) is a program used to assign genotypes to populations from a reference dataset (PIRY & al. 2004). For each sample, the result of the analysis is a probability of assignment to each population, in the present case, to each species. As the reference dataset showed hierarchical clustering into species groups first, which confused assignment within species groups, GC2 was first run on reference and tested individuals of all species; subsequently, GC2 was run separately for each species group. Assignment probabilities of the second GC2 runs were used for species identification. The highest probability score in each reference group was retained for species identifications, except when the probabilities were below 0.01 for each species. Assignment tests were run with the simulation algorithm of PAETKAU & al. (2004), with criteria as per PAETKAU & al. (1995) and 1000 simulated individuals.

The identification or assignment results from all three methods were compared for each sample to reach a consensus. All samples with at least 2 identical species identifications, and a non-contradictory third, were assigned to the consensus species. When two methods contradicted a third, the assignment and clustering probabilities were checked, and if the contradicting method was ambiguous, it was assigned to the majority. For instance, individual N_e05 was identified as *madeirense* by PCA and GC2, but as *subboreale* by DAPC; however, DAPC probabilities for *subboreale* were 0.516 vs 0.484 for *madeirense*; it was therefore considered as *madeirense*.

To check the identification results and help the reader who is more used to seeing STRUCTURE outputs, we ran STRUCTURE (PRITCHARD & al. 2000) with two different strategies, both with 10 runs of 200,000 burn-in iterations followed 200;000 iterations: i) the default STRUCTURE strategy is admixture, no priors; ii) an informed strategy with no admixture, priors (POPINFO flag) for the reference dataset, and with simulations updated only with information from the reference dataset. We ran simulations for the *nigerrimum* (with K=4 and K=5) and *erraticum* (with K=3 and K=4*)* groups separately, using the group information from the consensus between PCA, DAPC and GC2. We chose to run simulations with numbers of clusters corresponding to the number of species in each group, and also with that number + 1, as it is expected that that the species with the larger number of samples could be split between clusters (PUECHMAILLE 2016b). STRUCTURE results were analyzed with CLUMPAK (KOPELMAN & al. 2015), to control for clustering modes. All STRUCTURE figures show CLUMPAK major modes.

Results of species identification-by-genotyping

147 individuals belonging to the reference dataset and 413 from the test dataset. were genotyped. All microsatellite markers produced legible genotypes for all species. Allele numbers and sizes by species and markers can be found in Appendix S2 Table 3. Result tables from all three methods, as well as raw genotype data and geographical coordinates can be found in Appendix S3.

For PCA, ten axes were retained. All species could be separated by using the coordinates of the reference dataset genotypes (Appendix S4, Fig. 1-10).

DAPC revealed 15 clusters (Appendix S4, Fig. 11). For the reference individuals, clustering was clear:

- *T. darioi* samples were split into two clusters, with split probabilities (minimum 0.115) in each cluster, but with p=0 in all other 13 clusters.
- All *T. ibericum* samples were all found in one single cluster with p=1.
- *T. magnum* samples were split into two clusters, but with exclusive p = 1 in one or the other cluster.
- In *T. nigerrimum*, the situation was similar to *T. darioi* but over 3 clusters.
- *T. simrothi* samples were split into two exclusive clusters (samples from the Eastern Mediterranean in one cluster, Western Mediterranean samples in the other).
- All *T. erraticum* samples were all in one single cluster with p=1.
- In *T. madeirense* and *T. subboreale*, two closely related species the situation was more complex. Only nine *T. madeirense* were available for inclusion into the reference dataset vs 14 for *T. subboreale*. *T. madeirense* were split over three clusters with split probabilities which combined amount to 0.756 to 1; one individual had p=0.24 in the *T. subboreale* cluster. *T subboreale* were mostly found in one cluster, with probabilities above 0.75 for 10 individuals; 3 individuals had higher combined probabilities of belonging to one or more *T. madeirense* clusters, 1 individual was clearly placed within one of the *T. madeirense* clusters.

With GC2, the first run (Appendix S4, Fig. 12) resulted in 101 individuals assigned to the *Tapinoma erraticum* group, and 310 to the *T. nigerrimum* group. No *T. simrothi* could be detected. In the second hierarchical run, GC2 was able to assign all individuals from the *T. erraticum* group to species with >0.001 probability (Appendix S4, Fig. 13). In contrast, 11 of the *T. nigerrimum* group could not be assigned to species with probabilities >0.001 (Appendix S4, Fig. 14).

All the individuals could be assigned to a species. For 4 individuals, a third method was contradictory to the other two. Two individuals were identified as *Tapinoma madeirense* with PCA and with GC2 (p=0.17 vs p=0, and p=0.02 vs p=0) but *T. subboreale* with DAPC (resp. p=0.516 vs p=0.484 and p=0.709 vs p=0.291); they were considered *T. madeirense* for the subsequent analyzes. Two other individuals were assigned to *T. darioi* by PCA and DAPC, but to *T. ibericum* by GC2. Both individuals were p=0 for *T. ibericum* in DAPC (p=1 for *T. darioi*), and p=0.005 and p=0.019 for *T. ibericum* in DAPC (p=0.001 and p=0 for *T. darioi*). As the probabilities were very low in GC2, but very high in DAPC, both individuals were therefore assigned to *T. darioi* for the subsequent analyzes.

STRUCTURE results with the informed strategy gave exactly the same identifications as the consensus method (Fig. 13 and 15) except for the *erraticum* group, where the single *subboreale* sample was identified as *subboreale* for K=3, but as *madeirense* for K=4. It would seem that when an extra cluster is added, *madeirense* samples from the test dataset cluster together against *madeirense* from the *Reference* dataset. The default strategy results (Fig. 16) mixed *madeirense* and *subboreale* at K=3, grouping all the *madeirense* from the local sampling (i.e. the three in the *Reference* dataset as well as those from the *test* dataset) versus other European *madeirense* as well as all *subboreale*. With K=4, *madeirense* was split in two (local vs European), but *subboreale* was clearly separated from the two *madeirense* clusters; the *subboreale* sample from the test dataset as *subboreale* was recovered. It is difficult to conclude on this individual which could either truly belong to *subboreale* or to an additional *madeirense* cluster. The default strategy results for the *nigerrimum* group (Fig. 14) were as expected biased by the more numerous and diverse *nigerrimum* sensu stricto: at K=4 and for one mode (5/10) at K=5, magnum and *ibericum* clustered together while *nigerrimum* was split into 2 or 3 clusters. The second majority mode (5/10) however, recovered species as expected, with 2 *nigerrimum* clusters, but *ibericum* and *magnum* well separated.

Final identification results are therefore: 91, *Tapinoma madeirense*, 1 *T. subboreale* (dubious), 78 *T. darioi*, 6 *T. magnum* and 193 *T. nigerrimum* (+3 in the Reference dataset).

References

BLACKET, M.J., ROBIN, C., GOOD, R.T., LEE, S.F. & MILLER, A.D. 2012: Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. – Molecular Ecology Resources 12: 456-463.

CORDONNIER, M., GIBERT, C., BELLEC, A., KAUFMANN, B. & ESCARGUEL, G. 2019: Multi-scale impacts of urbanization on species distribution within the genus *Tetramorium*. – Landscape Ecology 34: 1937-1948.

CORDONNIER, M., BELLEC, A., DUMET, A., ESCARGUEL, G. & KAUFMANN, B. 2018: Range limits in sympatric cryptic species: a case study in *Tetramorium* pavement ants (Hymenoptera: Formicidae) across a biogeographical boundary. – Insect Conservation and Diversity 12:109–120.

JOMBART, T. 2008: Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. – Bioinformatics 24: 1403-1405.

JOMBART, T., DEVILLARD, S. & BALLOUX, F. 2010: Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. – BMC Genetics 11: 94.

KLARICA, J, BITTNER, L, PALLUA, J, PEZZEI C, HUCK-PEZZEI V, DOWELL F, SCHIED J, BONN GK, HUCK C, SCHLICK-STEINER BC, STEINER FM (2011) NEAR-INFRARED IMAGING SPECTROSCOPY AS A TOOL TO DISCRIMINATE TWO CRYPTIC *TETRAMORIUM* ANT SPECIES. JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY, 37:549–552.

KOPELMAN, N.M., MAYZEL, J., JAKOBSSON, M., ROSENBERG, N.A. & MAYROSE, I. 2015: Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. – Molecular Ecology Resources 15: 1179-1191.

PAETKAU, D., CALVERT, W., STIRLING, I. & STROBECK, C. 1995: Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. – Molecular Ecology 4: 347-354.

PAETKAU, D., SLADE, R., BURDEN, M. & ESTOUP, A. 2004: Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: A simulation-based exploration of accuracy and power. – Molecular Ecology 13: 55-65.

PIRY, S., ALAPETITE, A., CORNUET, J.M., PAETKAU, D., BAUDOUIN, L. & ESTOUP, A. 2004: GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. – Journal of Heredity 95: 536-539.

PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. – Genetics 155: 945-959.

PUECHMAILLE, S.J. 2016: The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. – Molecular Ecology Resources 16: 608-627.

SEIFERT, B., D'EUSTACCHIO, D., KAUFMANN, B., CENTORAME, M., LORITE, P. & MODICA, M.V. 2017: Four species within the supercolonial ants of the *Tapinoma nigerrimum* complex revealed by integrative taxonomy (Hymenoptera: Formicidae). – Myrmecological News 24: 123-144.

Appendix S2. Characteristics of microsatellite markers (Table 1), Fluorochrome tails sequence (Table 2) and population genetics characteristics of microsatellite markers per species (Table 3).

Appendix S2 Table 1: Characteristics of the microsatellite markers developed and used for the study.

Locus name	Accession number	Primer sequence 5'_3' F	Primer sequence 5'_3' R	Repeat motif	PCR Mix	Fluorochrome tails
Tma-F08		**GCCTCCCTCGCGCCA**ACAAATACGCGCAGATTTCGGCTC	ATACAGCCGGTCTTATCGTGTCTG	$(GA)_{11}$	A	tail a
Tma-H05		**GCCTTGCCAGCCCGC**GACTCTACAAATCAGCGAGCGCAC	GATACCCGGCAGATATCGAGCCGT	$(AC)_{10}$	A	tail b
Tma-B01		**GCCTTGCCAGCCCGC**CCGCCGTAACTTAGATCCCTACGT	GTACAATAAAGAACGCGTGGAACG	$(TC)_{11}$	A	tail b
Tma-H09		**CAGGACCAGGCTACCGTG**TTAACCGCGTAGAGCAACACTCTG	ATTGCAGCGAAGATTAATCAAGAC	$(CT)_{10}$	A	tail c
Tma-D05		**CGGAGAGCCGAGAGGTG**CCGCGACTCGATCTTGCGAAACTG	CATCACGTGCGATATGAGAACACG	$(AG)_{13}$	A	tail d
Tma-F10		**GCCTCCCTCGCGCCA**ATCGCACGGGATAATGAAAGATGC	TTCACTCGGGTCGTATTGTATCGC	$(TG)_{12}$	B	tail a
Tma-A11		**GCCTCCCTCGCGCCA**TTGTCGGAGATTATTAGGCGGCCG	TAAGAACGAAATGCTTCATGGTCC	$(AG)_{12}$	B	tail a
Tma-F12		**GCCTTGCCAGCCCGC**TTCGAGATGTGCTATTCTCGGTAC	GATAATAGCGGTTAAAAGACCTGC	$(GA)_{11}$	B	tail b
Tma-B10		**GCCTTGCCAGCCCGC**CCCGGTGCGTTAATGACTATACCC	TACGCCACTCTCAATTCTCGAAAG	$(TC)_{11}$	B	tail b
Tma-C03		**CAGGACCAGGCTACCGTG**ATTGAAAATCTTGGAAAAGTCTTG	GTCGAAACATCTTGCGGCTCTTGT	$(TG)_{16}$	B	tail c
Tma-A09		**GCCTCCCTCGCGCCA**CTTTGTACGTCCGCGGATTATTAC	TTTGTGTTATAAACACGCGCTGGC	$(TC)_{14}$	C	tail a
Tma-A10		**GCCTTGCCAGCCCGC**TATACACCGTCCGATGACGAATGC	ACGAAGGTTCGTTATCGCTTTTCG	$(AC)_{13}$	C	tail b
Tma-B03		**CAGGACCAGGCTACCGTG**AGGGATCTGTGTATCCCCGAGTAC	TGACACCACATGAGAGTGGGAAGG	$(CT)_{11}$	C	tail c
Tma-A03		**CAGGACCAGGCTACCGTG**CACGCGTGCGTACATGACTCAACC	TCCGCGCAATTTATTGCTCCCTTC	$(CA)_{11}$	C	tail c
Tma-E11		**CGGAGAGCCGAGAGGTG**ACAAAGAAGAAACGGAGCTTGCCG	CAGAGGAGGAGAGGTGTATCGGTG	$(TC)_{11}$	C	tail d

Appendix S2 Table 2: Fluorochrome tails sequences.

Tail	Fluorochrome	Tail sequence
Tail_A	6FAM	GCCTCCCTCGCGCCA
Tail_B	HEX	GCCTTGCCAGCCCGC
Tail_C	ATTO550	CAGGACCAGGCTACCGTG
Tail_D	ATTO565	CGGAGAGCCGAGAGGTG

Appendix S2 Table 3: Microsatellite markers characteristics for each species genotyped, based on both reference and test datasets. Classical indices were not relevant as both reference and test datasets comprise more than one population. NR = number of reference individuals, NT = number of test individuals, AR = number of alleles in reference samples, AT = number of allele in test samples, Span = sizes of the smallest and largest allele (reference and test samples together).

	darioi		***ibericum***		***magnum***		***nigerrimum***		***erraticum***		***madeirense***		***subboreale***		***Gr. simrothi***	
NR / NT	16	78	14	1	16	6	16	193	14	0	9	91	14	1	48	0
Marker	***AR/AT***	***Span***	***AR/AT***	***Span***	***AR/AT***	***Span***	***AR/AT***	***Span***	***AR/AT***	***Span***	***AR/AT***	***Span***	***AR/AT***	Span	***AR/AT***	***Span***
Tma-F08	12/12	126-172	8/0	124-160	10/6	122-158	5/8	128-152	14/0	132-182	4/3	122-128	2/1	122-124	7/0	118-132
Tma-H05	1/3	122-126	4/1	122-128	6/4	124-166	2/3	122-136	1/0	126	4/12	132-166	3/2	130-138	25/0	120-192
Tma-B01	4/3	223-235	5/2	225-233	7/5	227-245	3/5	233-241	16/0	231-285	3/5	231-239	2/2	231-235	9/0	215-233
Tma-H09	4/9	142-164	9/1	140-172	12/6	138-174	3/3	146-150	1/0	160	11/18	168-220	12/1	180-204	19/0	136-180
Tma-D05	3/2	116-124	3/1	116-136	6/3	122-132	3/2	118-122	2/0	126-132	2/2	128-136	2/1	130-136	4/0	120-126
Tma-F10	3/3	130-134	4/0	126-134	6/3	134-144	1/1	130	1/0	128	1/1	124	1/1	124	3/0	128-142
Tma-A11	2/2	187-189	5/0	185-193	5/4	187-195	2/2	187-191	8/0	199-221	3/3	183-187	2/1	183-185	2/0	175-177
Tma-F12	14/15	162-206	12/1	158-192	9/6	154-204	7/15	166-198	4/0	160-168	4/5	152-164	1/1	160	3/0	158-162
Tma-B10	1/1	235	2/1	231-243	9/7	247-277	1/5	231-283	14/0	281-317	17/57	231-480	25/1	325-459	3/0	239-245
Tma-C03	3/3	176-182	6/2	174-188	9/3	172-220	1/3	176-180	13/0	186-212	8/12	170-242	5/1	168-176	2/0	164-182
Tma-A09	2/2	108-110	4/1	110-116	8/7	112-144	2/1	108-110	14/0	104-140	10/22	102-206	21/2	106-210	13/0	106-164
Tma-A10	3/4	131-139	5/1	131-139	6/2	125-145	5/6	133-145	2/0	131-133	3/6	129-141	4/1	135-141	4/0	125-129
Tma-B03	6/4	110-140	6/1	120-138	6/6	114-140	5/6	124-138	10/0	140-160	3/3	124-138	1/1	124	15/0	120-164
Tma-A03	1/3	246-250	3/0	246-250	7/3	244-296	1/1	246-250	7/0	256-298	2/3	254-262	4/2	256-260	11/0	242-264
Tma-E11	3/5	169-239	15/1	165-223	5/4	159-191	11/21	173-217	13/0	167-203	11/20	161-243	16/2	167-229	15/0	153-185

Appendix S3. Excel file with genotypes, geographic coordinates, PCA, DAPC and GC2 result table. This appendix is available as separate file from the journal's webpages.

Appendix S4. Graphs of PCA, DAPC and STRUCTURE results.

- **Appendix S4.1 PCA results**: Figures 1-10 show PCA Axis 1 vs axes 2-10, with Fig. 1. showing Reference dataset only for Axes 1-2
- **Appendix S4.2 DAPC results:** Figure 11 upper panel shows DAPC probability of membership graphs for the Reference dataset, Figure 11 lower panel for the Test dataset; the two datasets were analyzed in a single DAPC run
- **Appendix S4.3 STRUCTURE results**: Figures 13-14 show STRUCTURE-CLUMPAK results for Reference and Test datasets in *T. nigerrimum* group. Figures 15-16 show results for both Reference and Test datasets for the *T. erraticum* group. In all figures, each bar represents a single individual, for which membership in each cluster (C1 to C5) is indicated by colors

Appendix S4.1 PCA results

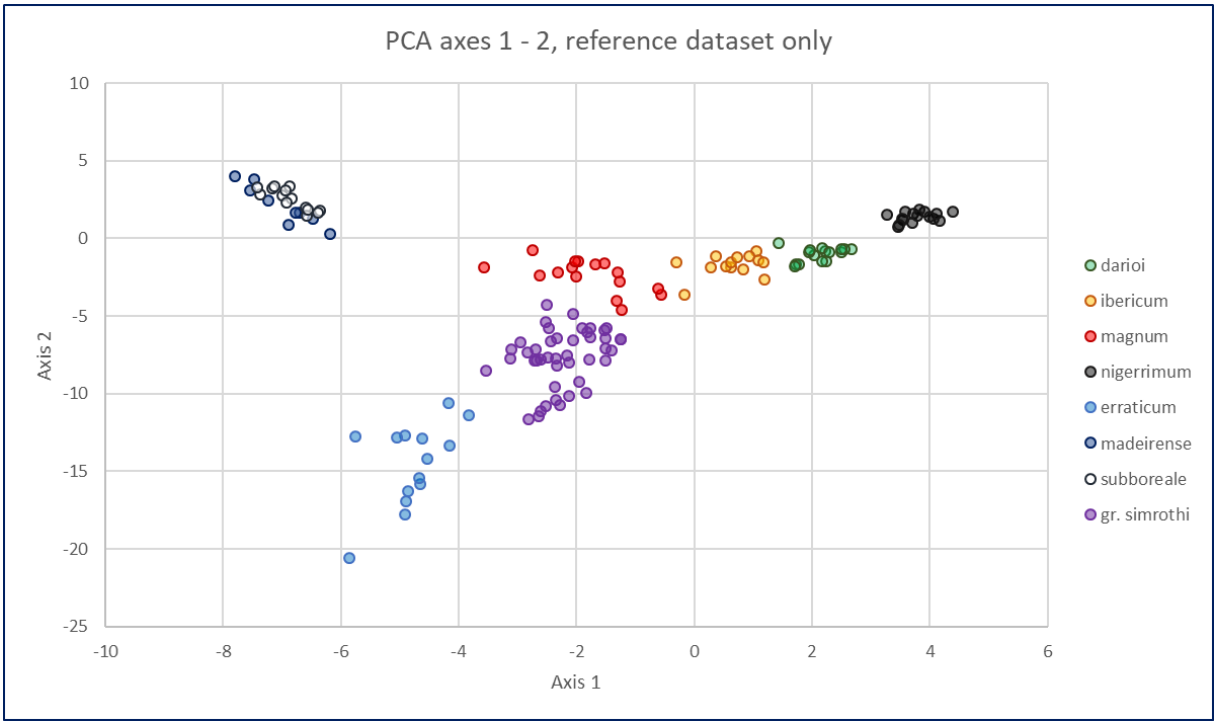


Fig. 1: Reference dataset PCA axes 1 and 2. All taxa except *madeirense* and *subboreale* are well separated. Two *ibericum* and two *magnum* samples are close on axis 1 and 2.

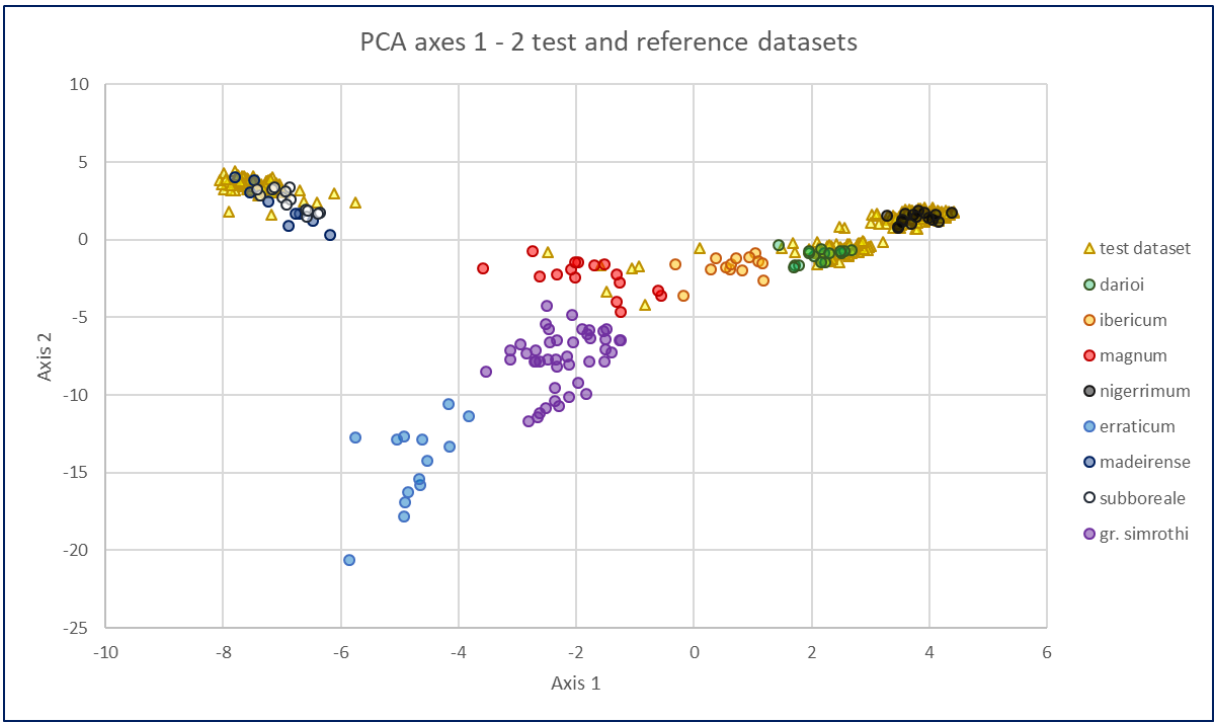


Fig. 2: Reference and test datasets PCA axes 1 and 2. No sample from the test dataset cluster with reference *T. simrothi* or *T. erraticum.*

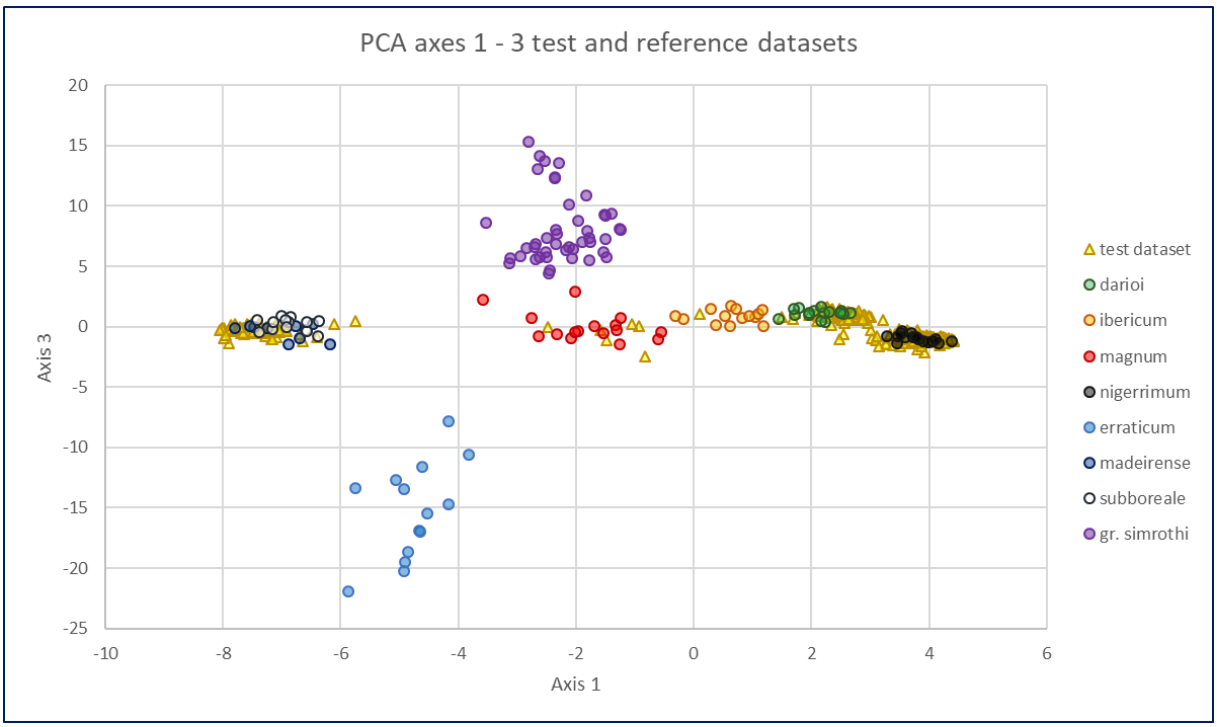


Fig. 3: Reference and test datasets PCA axes 1 and 3. Axis 3 make the *erraticum* and *simrothi* clusters more distinct.

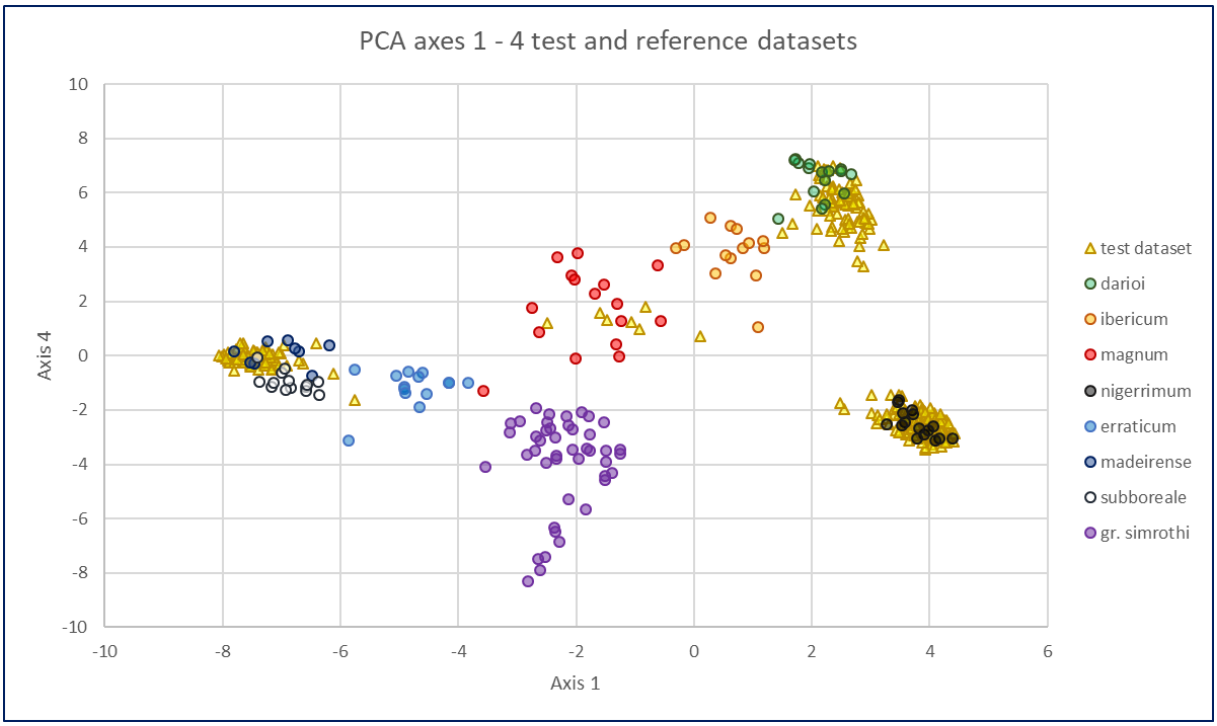


Fig. 4: Reference and test datasets PCA axes 1 and 4. Axis 4 clearly separate *darioi* from *nigerrimum.*

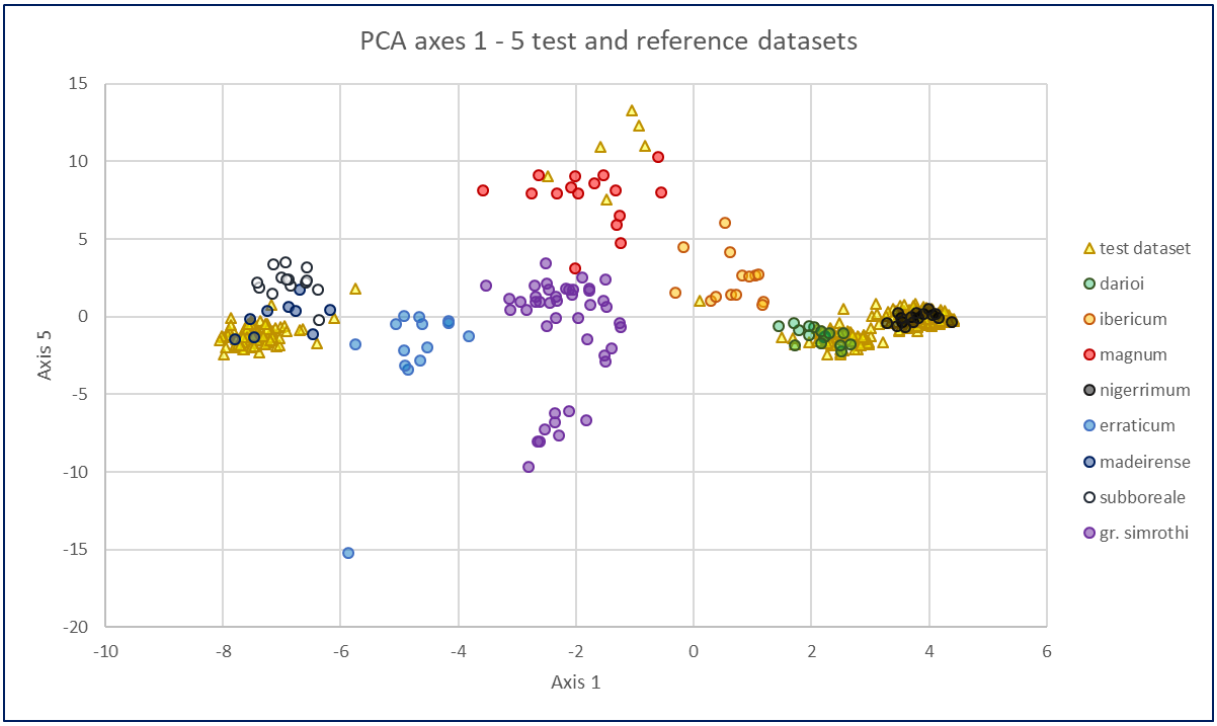


Fig. 5: Reference and test datasets PCA axes 1 and 5. Axis 5 separates *magnum* from *ibericum*, *ibericum* from *darioi*, and partly *madeirense* from *subboreale.*

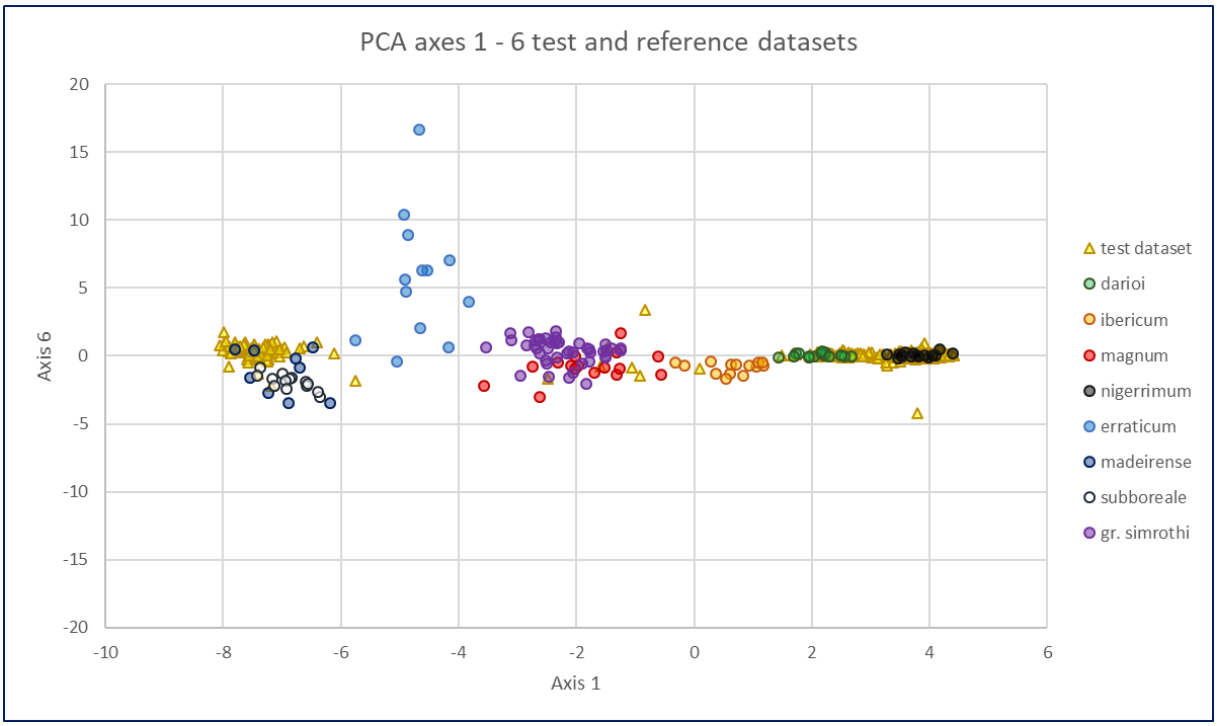


Fig. 6: Reference and test datasets PCA axes 1 and 6. Axis 6 shows diversity within reference *T. erraticum* and one differing test *T. nigerrimum.*

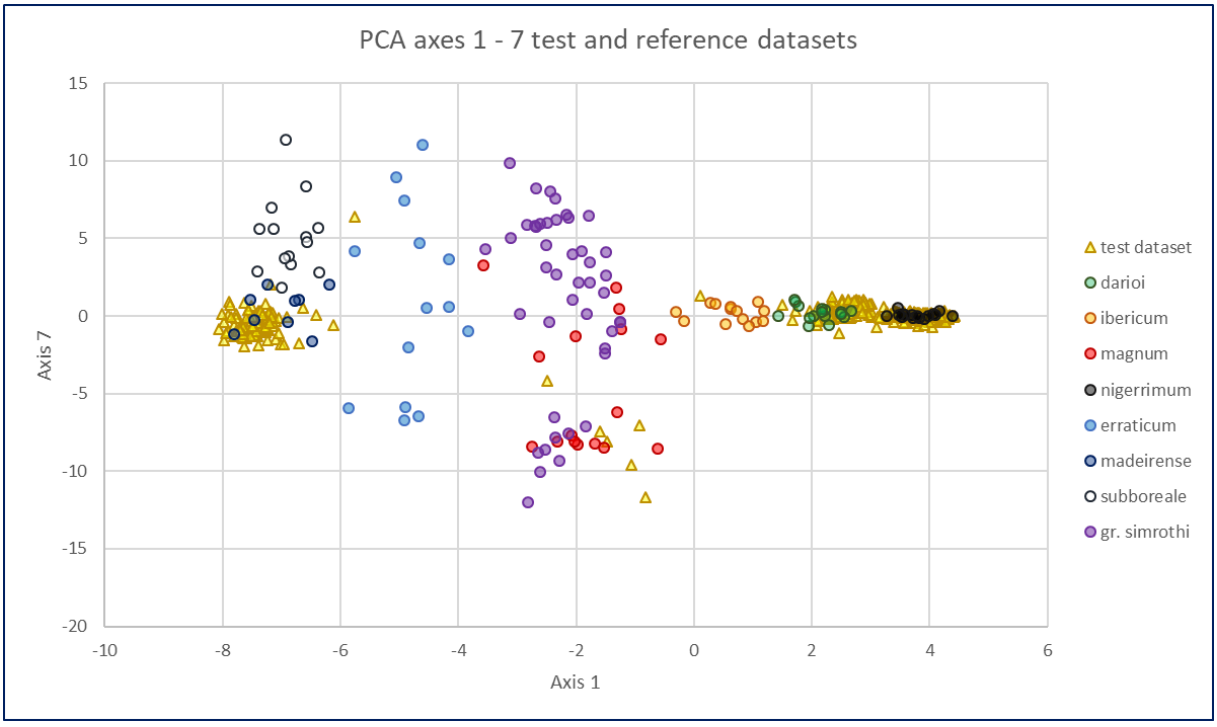


Fig. 7: Reference and test datasets PCA axes 1 and 7. Axis 7 shows diversity within reference *T. erraticum, T. simrothi and T. magnum.* Test dataset *T. magnum* samples are separated from all other species from the *T. nigerrimum* group. It also separates *T. madeirense* from *T. subboreale,* showing individual M_e09 clustering with *T. subboreale.*

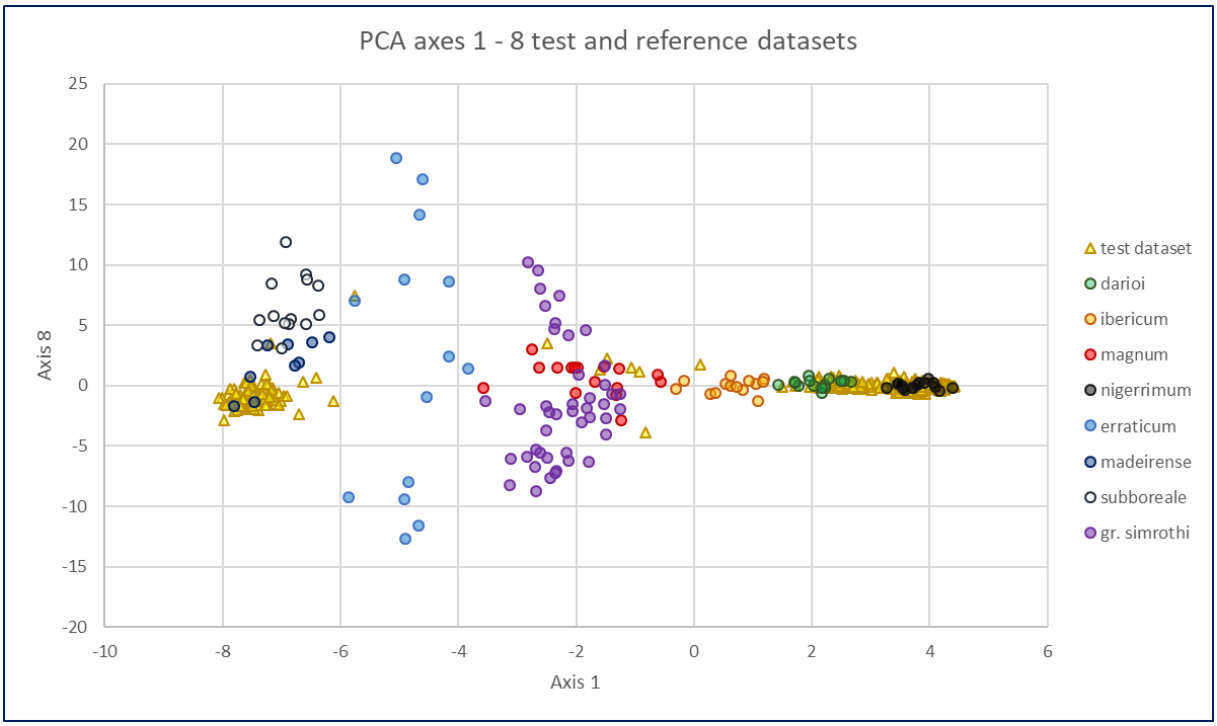


Fig. 8: Reference and test datasets PCA axes 1 and 8. Axis 8 again separate *T. subboreale* and *T. madeirense*, and shows diversity within *T. erraticum.*

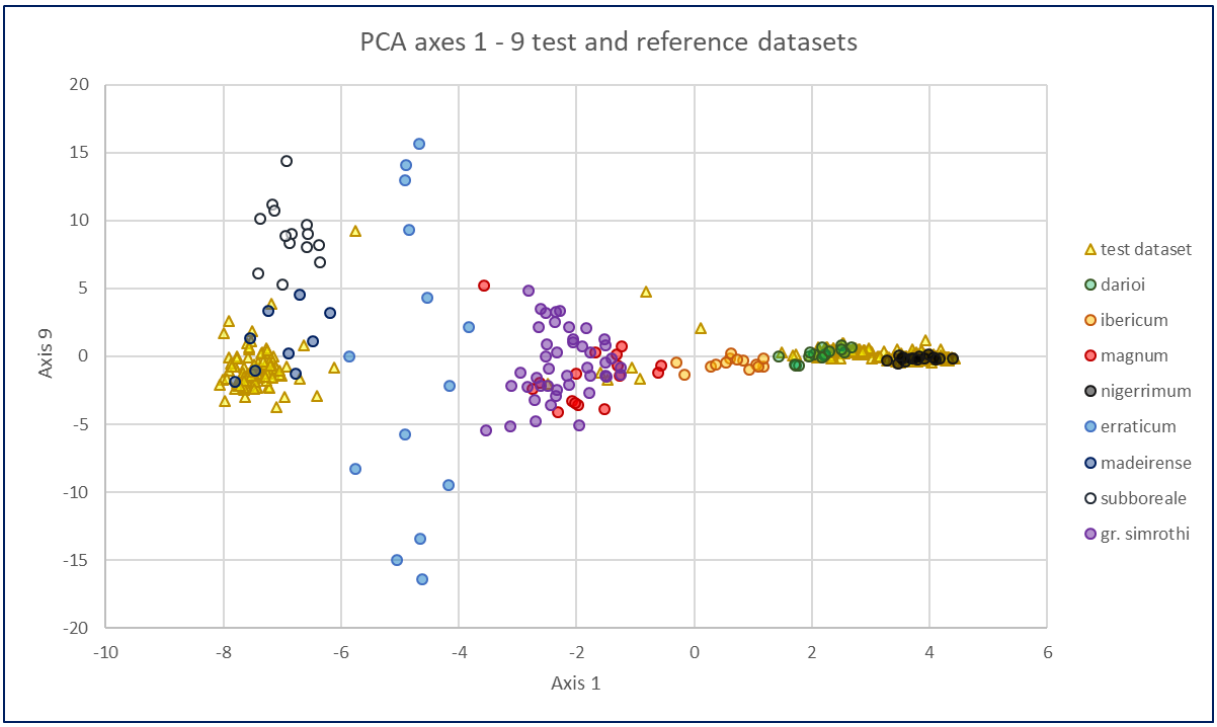


Fig. 9: Reference and test datasets PCA axes 1 and 9. Axis 9 again separate *T. subboreale* and *T. madeirense (*sample M_e09 clusters with *T. subboreale* in this graph*)*, and shows diversity within *T. erraticum.*

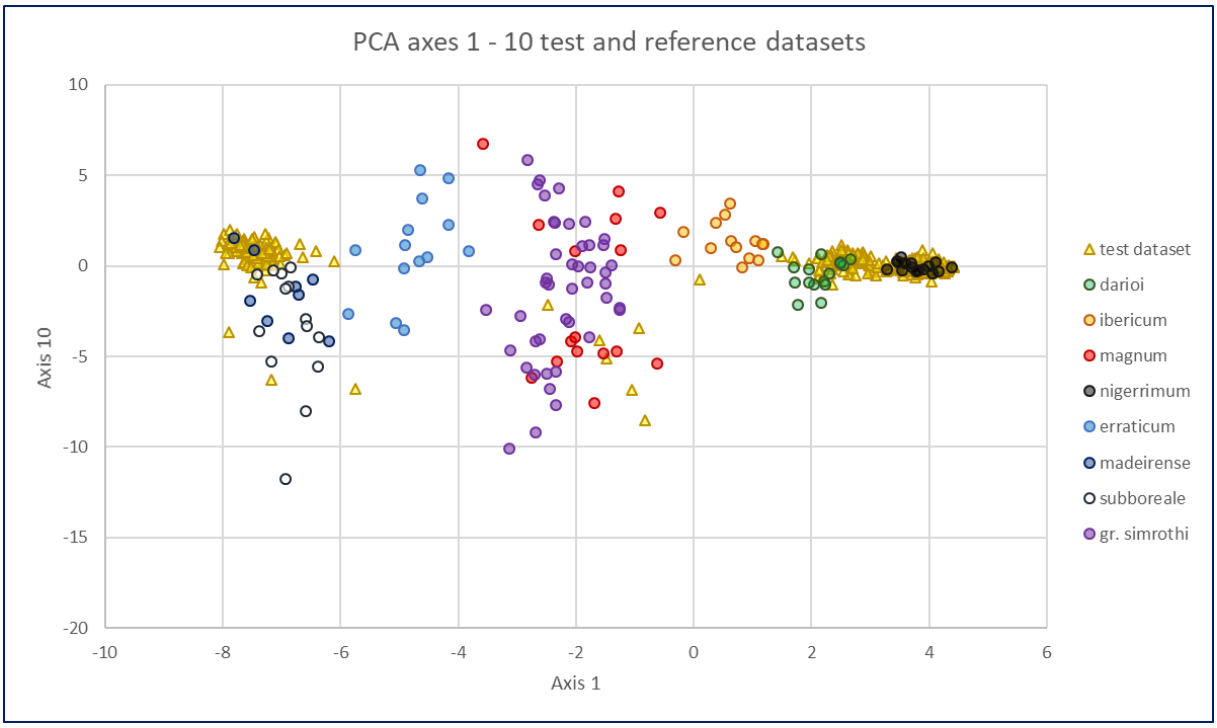


Fig. 10: Reference and test datasets PCA axes 1 and 10. Axis 10 again partly separate *T. subboreale* and *T. madeirense*, and shows diversity within *T. erraticum, T. magnum* and *T. simrothi.*

Appendix S4.2. DAPC results

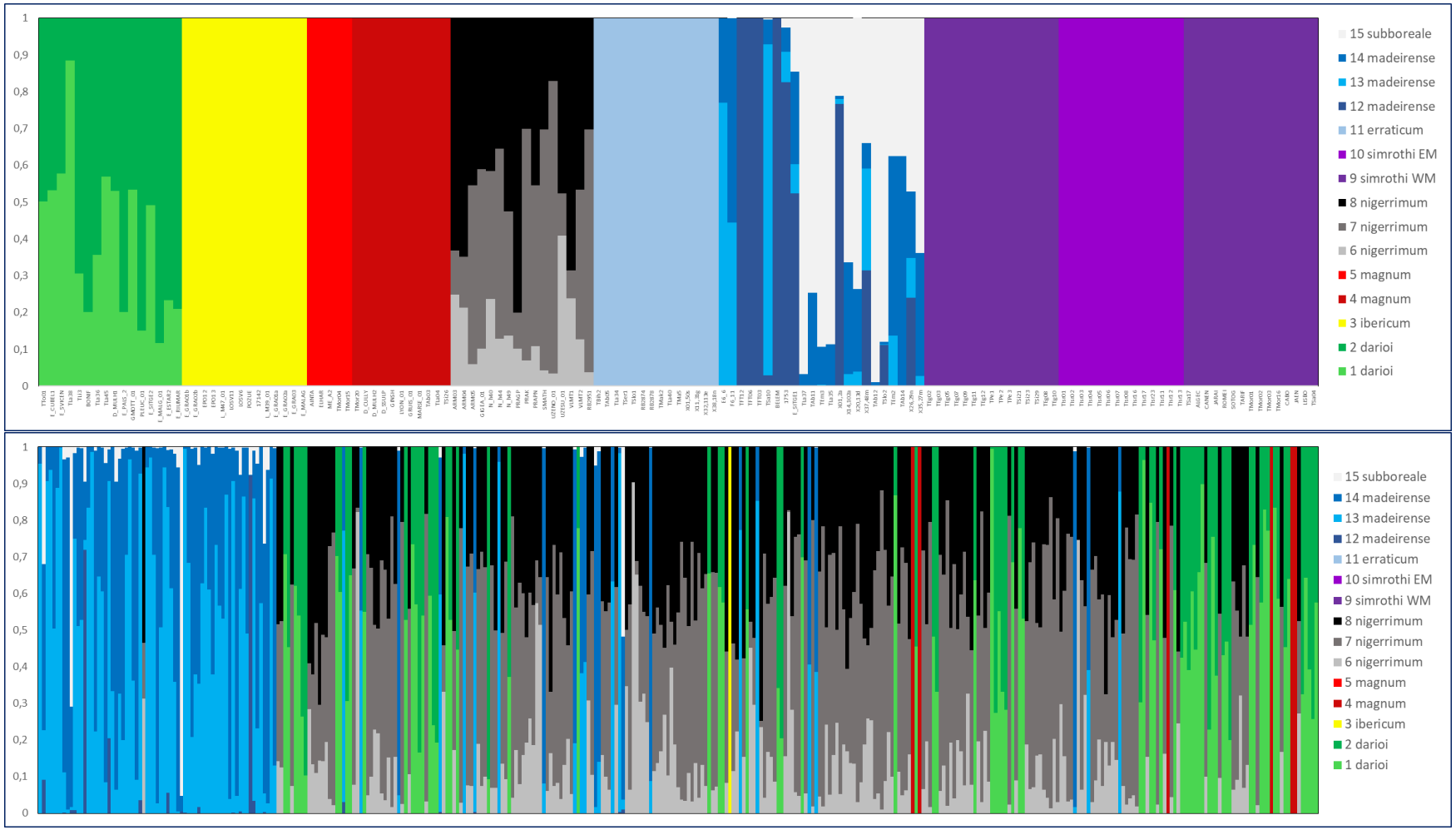


Fig. 11: Upper panel shows DAPC probability of membership for the Reference dataset, lower panel for the Test dataset; the two datasets were analyzed in a single DAPC run. Colors correspond to DAPC clusters, not to species, which can be split over more than one cluster, and in two different ways. The first way (e.g. *darioi*, *nigerrimum* or *madeirense* in the reference dataset), individual samples are split over the two or three clusters. The second way (e.g. *magnum* and *gr. simrothi* in the reference dataset), individuals have 100% membership in one of the two clusters; this suggests underlying genetic structure, as is the case here for Western and Eastern Mediterranean *T. simrothi* taxa; *T. magnum* could have a similar substructuring.

Appendix S4.3 STRUCTURE results: Figure 13-14 show STRUCTURE-CLUMPAK results for Reference and Test datasets in *T. nigerrimum* group. Figure 15-16 show results for both Reference and Test datasets for the *T. erraticum* group. In all figures, each bar represents a single individual, for which membership in each cluster (C1 to C5) is indicated by colors

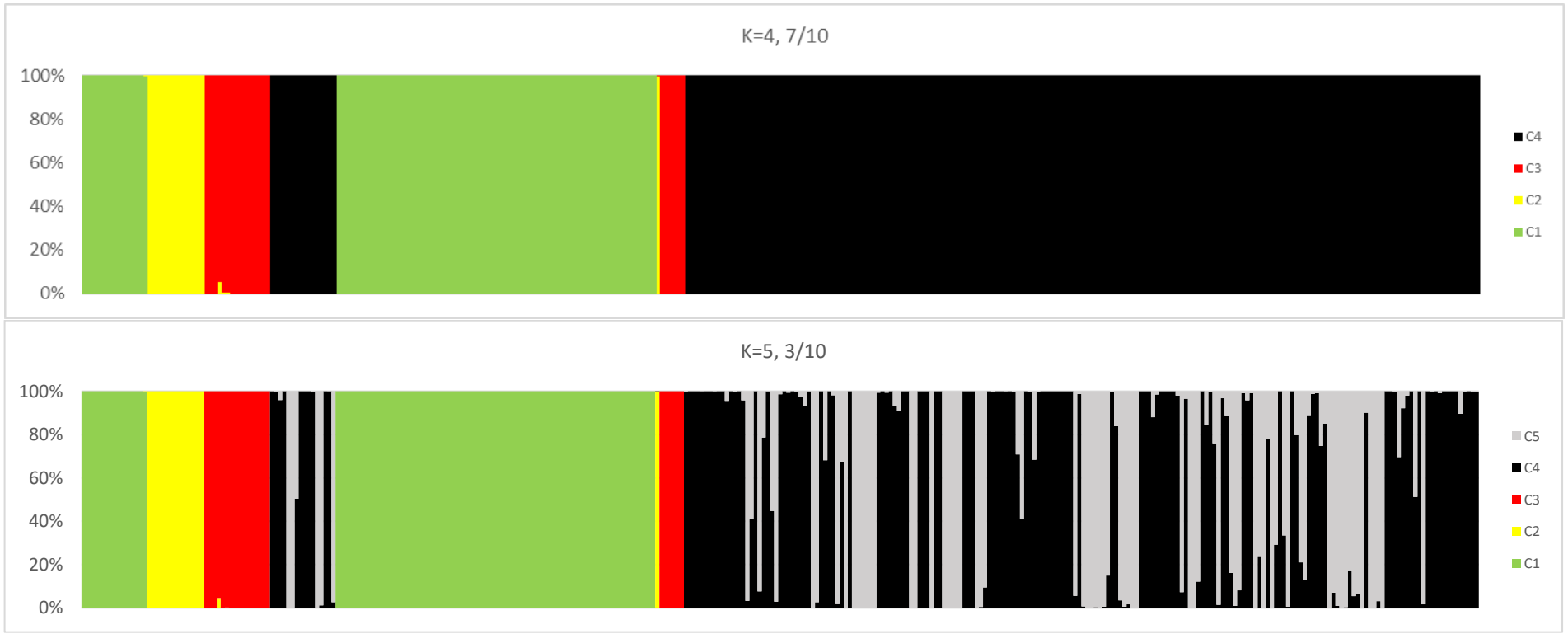


Fig. 13: Structure runs with priors for *T. nigerrimum* group. Parameters for Structure Runs: 10 runs, 200k Burn-in Iterations, 200k Iterations, model updated only with Reference dataset (POPFLAG on), no admixture. Upper panel shows results for K=4, major clustering model from Clumpak (7 runs/10). Lower panel shows results for K=5, major clustering model (there were 5 clustering models). Order of the individuals is from left to right: Reference dataset (*darioi*, *ibericum*, *magnum*, *nigerrimum*), Test dataset in order of species obtained from Consensus between PCA, DAPC and GENECLASS 2 (*darioi*, *ibericum*, *magnum*, *nigerrimum*), then in alphabetical order of sample name. Here in the upper panel Cluster 1 = *darioi*, Cluster 2 = *ibericum*, Cluster 3 = *magnum*, Cluster 4 = *nigerrimum*. In the lower panel, the additional Cluster 5 = *nigerrimum.*

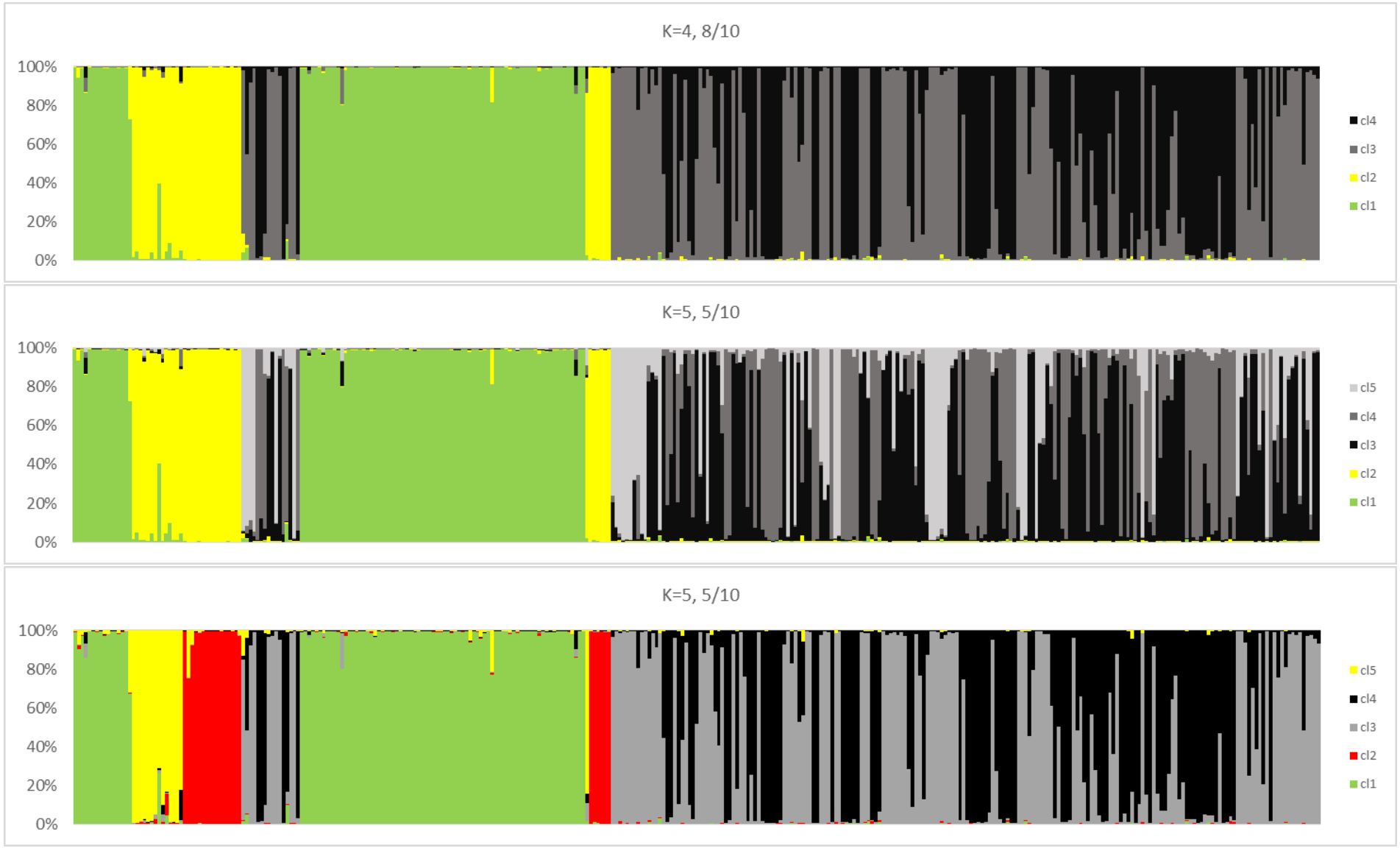


Fig. 14: Structure runs without priors for *T. nigerrimum* group. Parameters for Structure Runs: 10 runs, 200k Burn-in Iterations, 200k Iterations, no population prior, admixture. Upper panel shows results for K=4, major clustering model from Clumpak (8 runs/10). Middle and lower panels show results for K=5, major clustering models (5/10 runs each). Order of the individuals is from left to right: Reference dataset (*darioi*, *ibericum*, *magnum*, *nigerrimum*), Test dataset in order of species obtained from Consensus between PCA, DAPC and GENECLASS 2 (*darioi*, *ibericum*, *magnum*, *nigerrimum*), then in alphabetical order of sample name. In the upper panel Cluster 1 =

darioi, Cluster 2 = *ibericum* + *magnum*, Clusters 3 and 4 = *nigerrimum*. In the middle panel, Cluster 5 = *nigerrimum*. In the lower panel, Cluster 1 = *darioi*, Cluster 2 = *ibericum*, Cluster 3 = *magnum*, Cluster 4 + 5 = *nigerrimum.*

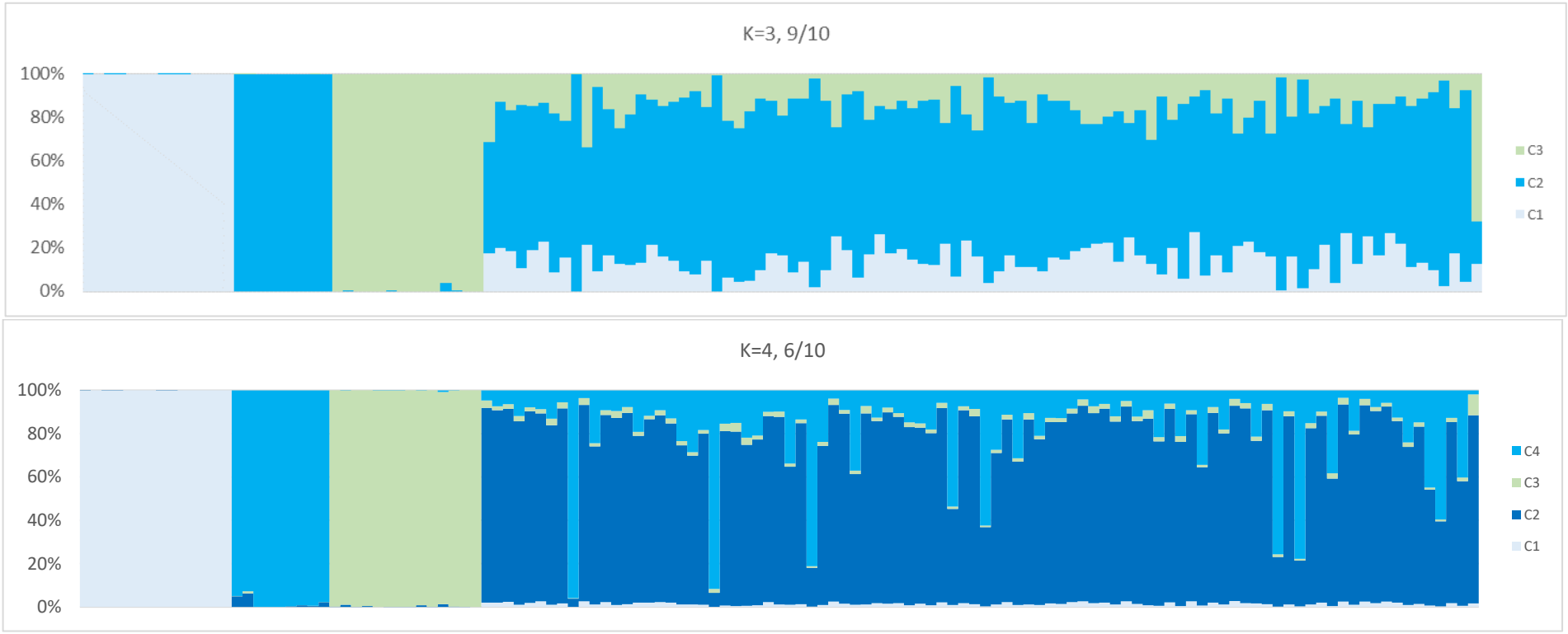


Fig. 15: Structure runs with priors for *T. erraticum* group. Parameters for Structure Runs: 10 runs, 200k Burn-in Iterations, 200k Iterations, model updated only with Reference dataset (POPFLAG on), no admixture. Upper panel shows results for K=3, major clustering model from Clumpak (9 runs/10). Lower panel shows results for K=4, major clustering model (6/10). Order of the individuals is from left to right: Reference dataset (*erraticum*, *madeirense*, *subboreale)* Test dataset in order of species obtained from Consensus between PCA, DAPC and GENECLASS 2 (*erraticum*, *madeirense*, *subboreale*), then in alphabetical order of sample name. Here in the upper panel Cluster 1 = *erraticum*, Cluster 2 = *madeirense*, Cluster 3 = *subboreale*. In the lower panel, the additional Cluster 4 = *madeirense*.

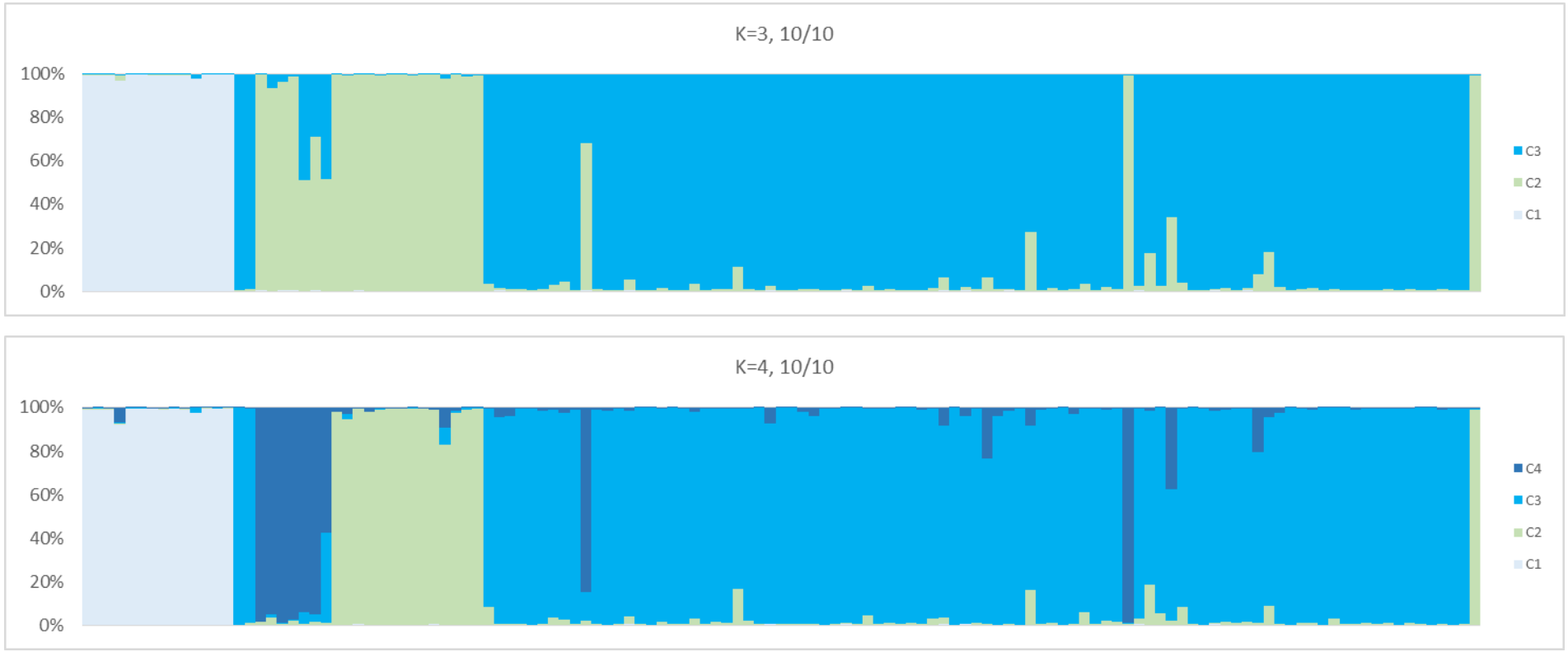


Fig. 16: Structure runs without priors for *T. erraticum* group. Parameters for Structure Runs: 10 runs, 200k Burn-in Iterations, 200k Iterations, no population prior, admixture. Upper panel shows results for K=3, single clustering model from Clumpak (10 runs/10). Lower panel shows results for K=4, single clustering model (10/10). Order of the individuals is from left to right: Reference dataset (*erraticum, madeirense, subboreale)* Test dataset in order of species obtained from Consensus between PCA, DAPC and GENECLASS 2 (*erraticum*, *madeirense*, *subboreale*), then in alphabetical order of sample name. Here in the upper panel Cluster 1 = *erraticum*, Cluster 2 = *madeirense/subboreale*, Cluster 3 = *subboreale*. In the lower panel, Cluster 1 = *erraticum*, Cluster 2 = *madeirense*, Cluster 3 = *madeirense*, Cluster 4 = *subboreale.*