

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Electromagnétisme et Systèmes Haute Fréquence

Présentée et soutenue par :

Mme MATHILDE LACOMBRADE

le jeudi 23 novembre 2023

Titre :

Dispersion, fourragement et cognition du frelon à pattes jaunes : vers de nouveaux moyens de lutte

---

École doctorale :

Génie Electrique, Electronique, Télécommunications (GEETS)

Unité de recherche :

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS)

Directeur(s) de Thèse :

M. HERVE AUBERT

M. MATHIEU LIHOREAU

Rapporteurs :

M. CEDRIC ALAUX, INRA AVIGNON

MME CLAIRE DETRAIN, UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

Membre(s) du jury :

M. JEAN-MARC DEVAUD, UNIVERSITE PAUL SABATIER, Président

M. ANTOINE COUTO, UNIVERSITE PARIS-SACLAY, Membre

M. DENIS THIERY, INRA VILLENAVE D'ORNON, Invité(e)

M. HERVE AUBERT, TOULOUSE INP, Membre

M. MATHIEU LIHOREAU, UNIVERSITE PAUL SABATIER, Membre

MME ANNE-NATHALIE VOLKOFF, INRAE MONTPELLIER, Membre

MME FANNY VOGELWEITH, M2I BIOCONTROL, Invité(e)

REMERCIEMENTS

Pour l'ensemble des travaux que j'ai pu réaliser au cours de ma thèse, je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs et directrices de thèse.

En premier lieu, je remercie Mathieu Lihoreau, qui, il y a 5 ans, m'a donné l'opportunité d'intégrer son équipe de recherche et qui depuis, m'a toujours accompagnée. Je le remercie particulièrement pour la confiance qu'il m'a témoignée et l'autonomie de travail qu'il m'a accordée. Je crois que cela a été très formateur pour moi. Je le remercie également d'avoir toujours répondu présent lorsque j'ai eu besoin de conseils ou d'aide, et ce, même en situation d'urgence.

Je tiens également à remercier Hervé Aubert avec qui je travaille également depuis 5 ans. Je le remercie pour sa bienveillance à mon égard. Il a en effet toujours pris le temps de m'expliquer les basiques de la physique, notamment sur le radar. Il m'a permis de combiner cette approche avec l'éthologie.

Je remercie également Denis Thiéry pour son soutien et sa bienveillance tout au long de ma thèse. Je le remercie de s'être toujours rendu disponible pour répondre à mes nombreuses interrogations mais également pour toutes celles qu'il a soulevées. Je le remercie aussi de m'avoir appris à décrocher des nids de frelons, une activité dangereuse mais indispensable.

Enfin, je remercie Fanny Vogelweith qui m'a transmis son goût pour l'immunité sociale et m'a témoignée une grande confiance. Fanny, qui par ses nombreux encouragements très remotivants, a toujours valorisé mon travail et pour cela, je la remercie aussi.

Je remercie également toute la bumblebee team : Stéphane (sans qui je n'aurais pas fait beaucoup de nutrition), Alex (sans qui je n'aurais pas beaucoup utilisé les radars), Coline, Thibault mais aussi ceux qui sont arrivés plus récemment au laboratoire : Charlotte, Loïc, Juliane. La cohésion et l'entre-aide que j'ai ressenties dans notre équipe a été d'un grand soutien.

Je remercie Tamara Gomez-Moracho de m'avoir formée, en tout début de thèse, sur la microbiologie et aussi de m'avoir aidée dans la mise en place de nombreux protocoles. Son aide a été indispensable. Merci à Cristian Pasquaretta qui a toujours pris le temps et eu la patience de m'expliquer de nombreux concepts en statistiques. Merci à Louise Riotte-Lambert de m'avoir soutenue dans mes projets et en statistiques. Merci également à Jacques Gautrais avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant ma thèse. Merci à Mathilde Ponchon qui a partagé avec moi nombre de ses connaissances en microbiologie. Merci à Juliette Poidatz qui a toujours répondu présente quand j'ai sollicité son aide. Merci à Dominique Henry et Alexandre Dore pour la partie physique des expériences radar.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont particulièrement aidé, notamment à la réalisation des nombreuses expériences. Sans eux, je n'aurais pas pu en faire autant. Avant tout, je remercie Blandine Mahot-Castaing, qui a abattu un énorme travail pour m'aider à réaliser un grand nombre d'expériences. Je la remercie pour son implication et sa ténacité. J'ai toujours pu compter sur elle et elle m'a été d'une grande aide, notamment au moment de la rédaction de mon manuscrit où elle a pris en charge tout une partie des expériences qui restaient à faire ce qui m'a permis d'obtenir les résultats escomptés dans les temps. Je remercie également Naïs Rocher, qui m'a beaucoup aidée pendant la première année de ma thèse dans la réalisation des expérimentations à Bordeaux. Je la remercie de s'être autant impliquée et d'avoir été si rigoureuse dans les expériences. Ce n'était pas

évident de travailler ensemble à distance mais je la remercie d'avoir toujours facilité nos échanges. Je remercie également Occiane Fousset pour sa patience quand elle m'a aidée à disséquer des milliers de frelons asiatiques et européens… Je remercie également Zoé Tourrain, Mael Rannou et Laurene Lebreton qui m'ont aidée à réaliser certaines expériences. Merci à Claude Nexon pour la construction des dispositifs expérimentaux et à Ben Paffhausen pour les impressions 3D. Merci à Marlène Botella et Isabelle Massou pour leur aide sur la partie biologie moléculaire.

Je remercie également tous mes amis et amies du laboratoire. Mille mercis puisque c'est grâce à eux que mes années à Toulouse ont été mémorables bien qu'ils m'aient beaucoup fatiguée avec toutes ces sorties… Merci aussi pour ces vacances communes : à Seignosse, aux ours, aux Etats Unis, à Guzet mais aussi dans les Cévennes. Un grand merci à Emilie qui m'a collé aux baskets pendant 3 ans mais avec qui j'ai eu la chance de partager plein de moments supers (MT180, Etats Unis) mais aussi très stressants (rendu du manuscrit, soutenance). Merci à Jordan de m'avoir tiré dessus un nombre incalculable de balles de paintball. Merci à Yuan de m'avoir initié à la flash nap. Merci à Ines d'avoir supporté beaucoup de mes plaintes au bureau. Merci à Julie pour ces nombreuses soirées. Merci à Nour de m'avoir fait autant rire. Merci à Alid de ne pas m'avoir offert des tongs. Merci à Manon de m'avoir rassuré dans mes moments de doutes. Merci à Louise pour toutes ces années d'entre-aide. Mais merci aussi à Mathieu, Léo, Josselin, Hugo, Marco. Merci aux anciens et anciennes : Alex R, Greg, Flora, Flo, Aurèle, Louis, Matthias, Farès.

Je remercie également tous mes amis et amies de Montpellier d'avoir supporté mes histoires de frelons et de m'avoir encouragé : Mathilde, Marielle, Léna, Margot, Ziz, Megan, Laurie, Mel, Louis-Jo, Hugo, 2B.

Enfin, je remercie mes parents de m'avoir autant soutenu et encouragé à poursuivre mes études dans cette voie. Je remercie mes grands-parents qui, eux aussi, m'apportent au quotidien un soutien indéfectible. Merci à mes frères et sœurs : Julie, Paul et Antoine qui m'ont toujours encouragé. Enfin, merci à toute la famille au grand complet : Pascale, Virginie, JL, Annabelle, Pierre-Yves (merci pour les photos de frelons), Irène, Christian, Louise, Charles, Benoit, Léo et Guillaume.

FINANCEMENT

Cette thèse CIFRE a été réalisée au sein de l'entreprise M2i Biocontrol et en collaboration avec les laboratoires de recherche du LAAS-CNRS, du CRCA-CBI et de l'INRAe de Bordeaux. Cette thèse a été financée par l'ANRT (CIFRE n°2020_0399) et par l'ADEME (n°2082C0061).

La liste des travaux que j'ai présenté sous forme d'articles scientifiques ou de communications orales, les actions de vulgarisation scientifique et les activités d'encadrements que j'ai réalisées ont été résumées en Annexe 1.

RÉSUMÉ

Le nombre d'espèces invasives dans le monde ne cesse d'augmenter. Celles-ci peuvent engendrer des problèmes économiques et écologiques en déséquilibrant les écosystèmes dans lesquels elles sont introduites. En 2004, le frelon asiatique, *Vespa velutina nigrithorax*, a été accidentellement introduit en France. Depuis, ce frelon invasif s'est dispersé dans 11 pays européens. Le régime alimentaire du frelon asiatique est composé à plus de 30% d'abeilles domestiques ce qui impacte la pollinisation et la filière apicole. L'objectif de ma thèse était de comprendre comment le frelon asiatique se disperse et exploite les ressources présentes dans son environnement afin d'améliorer les méthodes de lutte existantes et d'en proposer de nouvelles. Pour cela, j'ai combiné plusieurs approches expérimentales en laboratoire et sur le terrain pour étudier à la fois le frelon asiatique et les espèces non cibles potentiellement affectées par ces méthodes de lutte (bourdons, guêpes).

Je me suis d'abord intéressée au comportement des frelons. Dans le chapitre 1, j'ai étudié les mécanismes qui pourraient expliquer la rapidité de dispersion de l'espèce en Europe. Grâce à une approche de science participative, j'ai démontré que les fondatrices de frelons asiatiques sur les fronts d'invasion ont des phénotypes alaires favorisant une meilleure capacité de dispersion. Ces traits semblent résulter d'un phénomène évolutif de tri spatial. Dans le chapitre 2, je me suis intéressée à l'utilisation des informations visuelles et sociales permettant aux frelons de trouver de la nourriture et donc de s'adapter à de nouveaux milieux au cours de leur dispersion. J'ai montré que les frelons apprennent à reconnaître les sources de nourriture grâce à des signaux visuels et qu'ils sont capables de modifier ces apprentissages en fonction de l'abondance des ressources. J'ai également montré l'existence d'une influence sociale qui permet aux frelons asiatiques de sélectionner les sources de nourriture déjà occupées par d'autres frelons et donc potentiellement d'augmenter leur efficacité de fourragement. Cette attraction sociale sur les sites de nourriture pourrait être utilisée dans les méthodes de piégeage sur les ruchers.

Sur la base de ces travaux, j'ai ensuite exploré de nouvelles méthodes de lutte contre le frelon asiatique. En particulier, dans le chapitre 3, j'ai relaté ma participation au développement d'un système de tracking basé sur le fonctionnement de radars à ondes électromagnétiques. J'ai obtenu les premières trajectoires de vol de frelons en trois dimensions. J'ai aussi rendu compte d'une expérience qui démontre que les ondes millimétriques émises par ces radars ne sont pas détectées par les insectes. Dans le futur, ce nouvel outil de tracking permettra de suivre les déplacements des frelons et d'aider à la localisation des nids. Dans le chapitre 4, j'ai évalué l'efficacité d'un parasite, *Metarhizium robertsii,* contre le frelon asiatique et ses potentiels effets indésirables sur les espèces non cibles. Mes résultats démontrent un effet concentration de *M. robertsii* sur la survie et les comportements de toilettage et/ou alimentaires de ces espèces. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour conclure à l'efficacité de cette méthode de biocontrôle.

L'ensemble de mes travaux augmente la compréhension du comportement du frelon asiatique et permet d'apporter des solutions quant à l'amélioration des méthodes qui pourraient de diminuer leur pression sur les ruchers. L'impact du frelon asiatique sur les populations d'insectes sauvages est encore mal connu. Cependant, mes travaux sur le comportement de butinage soulignent un rôle potentiellement bénéfique du frelon en tant que pollinisateur. Je discute comment dans des environnements où les pollinisateurs sauvages déclinent, il pourrait être envisagé d'utiliser le frelon asiatique comme pollinisateur tout en préservant les ruchers de sa pression de prédation.

Mots-clés : *Vespa velutina,* invasion, influence sociale, radar, lutte biologique

ABSTRACT

The number of invasive species in the world is constantly increasing. These species could cause economic and ecological problems by destabilising the ecosystems into which they are introduced. In 2004, the Asian hornet, *Vespa velutina nigrithorax*, was accidentally introduced into France. Since then, this invasive hornet has spread through 11 European countries. More than 30% of the Asian hornet's diet consists of honeybees, which has an impact on pollination and the beekeeping industry. The aim of my thesis was to understand how the Asian hornet disperses and exploits the resources present in its environment to improve existing control methods and propose new ones. To do this, I combined several experimental approaches in the laboratory and in the field to study both the Asian hornet and non-target species potentially affected by these methods of control (bumblebees, wasps).

I was first interested by the behaviour of hornets. In Chapter 1, I studied the mechanisms that might explain the rapid dispersal ability of the species in Europe. Using a citizen science approach, I demonstrated that Asian hornet foundresses on invasion fronts have wing phenotypes that favour a better dispersal capacity. These traits seem to result from an evolutionary phenomenon called spatial sorting. In Chapter 2, I looked at how hornets use visual and social information to find food and thus adapt to new environments during their spreading. I showed that hornets learn to recognize food sources using visual signals and that they could modify this learning according to the abundance of resources. I also demonstrated the existence of a social influence that enables Asian hornets to select food sources already occupied by other hornets and thus potentially increase their foraging efficiency. This social attraction to food sites could be used in apiary trapping methods.

Based on this work, I explored new methods for reducing the Asian hornet population. In Chapter 3, I took part in a developing a tracking system based on the operation of electromagnetic wave radars. I obtained the first three-dimensional flight trajectories of hornets and carried out an experiment demonstrating that the millimeter waves emitted by these radars are not detected by insects. In the future, this new development will allow to track hornet movements and helps to locate nests. In Chapter 4, I assessed the effectiveness of a parasite, *Metarhizium robertsii*, against the Asian hornet and its potential undesirable effects on non-target species. My results showed a concentration effect of *M. robertsii* on the survival and grooming and/or feeding behaviour of these species. Further work is required to conclude whether this biocontrol method is effective.

My work increases our understanding on Asian hornet behaviour and provides solutions for improving methods aiming to reduce pressure on apiaries. The impact of the Asian hornet on wild insect populations is still poorly understood. However, my work on foraging behaviour highlights its potential beneficial role as a pollinator. I discuss how, in environments where wild pollinators are declining, it might be possible to use the Asian hornet as a pollinator while protecting apiaries from its predatory pressure.

Key-words : *Vespa velutina,* invasion, social influence, radar, biological control

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GÉNÉRALE 17

1. LE FRELON ASIATIQUE : UNE ESPECE INVASIVE 18
2. BIOLOGIE ET COMPORTEMENT DU FRELON ASIATIQUE 25
3. LA LUTTE CONTRE LE FRELON ASIATIQUE : METHODES EXISTANTES ET LIMITES 34
4. OBJECTIFS DE LA THESE 37

CHAPITRE 1 : DIFFÉRENCIATION DES PROFILS ALAIRES DES FRELONS ASIATIQUES SUR LE FRONT D'INVASION EUROPÉEN 40

RÉSUMÉ 41
CONTRIBUTIONS 42
INTRODUCTION 43
MATÉRIEL ET MÉTHODES 45
RÉSULTATS 53
DISCUSSION 58

CHAPITRE 2 : UTILISATION D'INFORMATIONS VISUELLES ET SOCIALES DANS LE CHOIX DES SITES DE FOURRAGEMENT 63

RÉSUMÉ 64
INTRODUCTION 65
SOUS-CHAPITRE 2.1 : APPRENTISSAGE VISUEL ET FLEXIBILITÉ ..... COGNITIVE POUR IDENTIFIER DES RESSOURCES 67
CONTRIBUTIONS 67
INTRODUCTION 68
MATÉRIEL ET MÉTHODES 70
RÉSULTATS 75
DISCUSSION 78
REMERCIEMENTS 79
SOUS-CHAPITRE 2.2 : INTERATTRACTION DES FRELONS SUR LES SITES DE NOURRITURE 81
CONTRIBUTIONS 81
INTRODUCTION 82
MATÉRIEL ET MÉTHODES 85
RÉSULTATS 89

DISCUSSION *95*
DISCUSSION 100

CHAPITRE 3 : EVALUATION D'UN OUTIL RADAR POUR SUIVRE LES TRAJECTOIRES DE VOL ET DÉTECTER LES NIDS DE FRELONS 103

RÉSUMÉ 104
CONTRIBUTIONS 105
INTRODUCTION 106
MATÉRIEL ET MÉTHODES 112
RÉSULTATS 121
DISCUSSION 126

CHAPITRE 4 : EXPLORATION ET DÉVELOPPEMENT D'UNE SOLUTION DE BIOCONTROLE 131

RÉSUMÉ 132
CONTRIBUTION 133
INTRODUCTION 134
MATÉRIEL ET MÉTHODES 142
SOUS-CHAPITRE 4.1 : SENSIBILITÉ AUX SPORES DES ESPECES CIBLES ET NON CIBLES 147
INTRODUCTION *147*
MATÉRIEL ET MÉTHODES *149*
RÉSULTATS *152*
DISCUSSION *155*
SOUS-CHAPITRE 4.2 : EFFETS SUBLETAUX DE METARHIZIUM SUR LE FRELON ASIATIQUE 157
INTRODUCTION *157*
MATÉRIEL ET MÉTHODES *159*
RÉSULTATS *162*
DISCUSSION *164*
SOUS-CHAPITRE 4.3 : COMPORTEMENT DE DÉFENSE DES ESPECES NON CIBLES 167
INTRODUCTION *167*
MATÉRIEL ET MÉTHODES *170*
RÉSULTATS *175*
DISCUSSION *181*
REMERCIEMENTS *184*
DISCUSSION 185

DISCUSSION GÉNÉRALE 192

1. La dispersion du frelon et son adaptabilite dans les nouveaux milieux 194
2. Vers une solution durable pour reduire la pression de predation ? 198
3. Apprendre a vivre avec les frelons 202

CONCLUSION GÉNÉRALE 205

BIBLIOGRAPHIE 207

ANNEXES 232

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 22

FIGURE 2 24

FIGURE *3* 26

FIGURE 4 27

FIGURE 5 28

FIGURE 6 31

FIGURE 7 46

FIGURE 8 48

FIGURE 9 53

FIGURE 10 54

FIGURE 11 57

FIGURE 12 75

FIGURE 13 76

FIGURE 14 85

FIGURE 15 89

FIGURE 16 91

FIGURE 17 93

FIGURE 18 99

FIGURE 19 107

FIGURE 20 110

FIGURE 21 111

FIGURE 22 113

FIGURE 23 116

FIGURE 24 117

FIGURE 25 122

FIGURE 26 124
FIGURE 27 125
FIGURE 28 139
FIGURE 29 140
FIGURE 30 143
FIGURE 31 153
FIGURE 32 161
FIGURE 33 162
FIGURE 34 163
FIGURE 35 172
FIGURE 36 176
FIGURE 37 177
FIGURE 38 178
FIGURE 39 179
FIGURE 40 180
FIGURE 41 186
FIGURE 42 186
FIGURE 43 187
FIGURE 44 236
FIGURE 45 262

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 36

TABLEAU 2 70

TABLEAU 3 92

TABLEAU 4 94

TABLEAU 5 150

TABLEAU 6 154

TABLEAU 7 154

TABLEAU 8 159

TABLEAU 9 237

TABLEAU 10 238

TABLEAU 11 261

TABLEAU 12 263

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans l'ensemble du manuscrit, l'espèce *Vespa velutina nigrithorax* sera désignée par les termes « frelon à pattes jaunes » ou « frelon asiatique ». Le frelon *Vespa crabro* sera désigné par « frelon européen ».

1. Le frelon asiatique : une espèce invasive

1.1. Les espèces invasives

Le nombre d'espèces considérées comme invasives ne cesse d'augmenter et pose des problèmes majeurs pour l'écologie et l'économie mondiale (Simberloff et al. 2013). Conformément aux définitions de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature), de la Convention sur la diversité biologique, du Parlement européen et du Conseil de l'Europe, une espèce exotique envahissante est une espèce introduite par l'homme en dehors de son aire de répartition naturelle (volontaire ou accidentelle) et dont l'implantation et la propagation menacent les écosystèmes, les habitats ou les espèces indigènes avec des conséquences économiques et/ou écologiques et/ou sanitaires négatives. En effet, elles causent de nombreux dommages et de pertes environnementales qui sont chiffrées à 120 milliards de dollars par an aux Etats Unis (Pimentel et al. 2005) et à plus de 960 millions de dollars en moyenne annuelle en Europe (Haubrock et al. 2021). La présence des espèces invasives dans les nouvelles zones occupées perturbe l'ensemble des écosystèmes et contribue à : (1) l'extinction des espèces et l'altération de la structure des communautés (par concurrence avec les espèces natives, la modification des interactions entre les espèces et leur abondance, ce qui peut influencer des processus écosystémiques, Chapin et al. 2000), (2) la modification du cycle de l'énergie, des nutriments et de l'eau, (3) la modification des régimes de perturbations (feu, érosion, inondation), la modification du climat (composition atmosphérique) et de l'habitat physique (habitats moins adaptés à d'autres espèces) (Nentwig 2008).

Une espèce devient invasive lorsqu'elle est introduite dans un nouveau milieu, qu'elle réussit à s'y établir et à se disperser. La dispersion est le résultat de la somme de plusieurs événements. Pour s'établir, l'espèce introduite doit franchir différentes barrières notamment celles de la survie et de la reproduction (Blackburn et al. 2011). Pour cela, des mécanismes évolutifs peuvent favoriser des espèces à devenir invasives. Ces mécanismes peuvent intervenir en amont de l'introduction : certaines espèces peuvent posséder une préadaptation phénotypique pour un type de milieu et qui peut favoriser leur transport, leur introduction et leur établissement dans ce nouvel environnement (Suarez et al. 2008). Par exemple, certaines espèces de fourmis, du fait de leur structure coloniale plastique temporellement et spatialement, sont facilement déplacées sur de longues distances via des objets transportés par l'Homme (terre, eau) (Suarez et al. 2008). Elles sont donc fréquemment introduites dans de nouveaux environnements. Après la phase d'introduction, d'autres mécanismes évolutifs peuvent intervenir et conduire à l'augmentation de la taille de la population avant sa dispersion. Le délai entre l'introduction et la dispersion de la population peut être simplement lié au temps nécessaire pour que la taille de la population introduite augmente. Ce délai peut également résulter d'une évolution adaptative des espèces introduites à leur nouvel environnement. Ces changements génétiques peuvent s'opérer à la suite à l'introduction supplémentaire de nouveaux individus dans le milieu (deuxième introduction), d'une hybridation avec une espèce native ou encore à la suite de l'acquisition de nouveaux traits génétiques (Suarez et al. 2008).

Depuis 1800, en Europe, le taux annuel d'introduction de plantes et d'animaux est en augmentation progressive (Hulme 2009). Les caractéristiques géographiques et taxonomiques des invasions biologiques sont fortement influencées par le commerce et les transports humains (Perrings et al. 2005; Meyerson and Mooney 2007). Plusieurs études montrent que les changements climatiques pourraient augmenter le risque d'invasions biologiques dans le monde (Bradley et al. 2012; Walter) et que ces dernières seront croissantes en Europe de l'Est, à l'Est de l'Amérique du Nord et en Océanie (Bellard et al. 2013).

Une liste mondiale des 100 espèces invasives les plus dangereuses a été établie et actualisée en 2013 par l'ISSG (*Invasive Species Specialist Group*). Une liste européenne a également été mise en place par la commission européenne grâce au règlement n°1143/2014. En 2022, cette liste (règlement d'exécution 2022/1203) faisait état de 30 nouvelles espèces et portait le total à 96 espèces, 54 animales et 42 végétales.

Les insectes sociaux sont des groupes d'insectes caractérisés par une interattraction mutuelle de leurs membres (Grassé 1952; Costa 2018). Parmi eux, on compte les hyménoptères tels que les fourmis, les abeilles ou les guêpes qui font partie des espèces les plus hautement invasives au monde. Seulement 2% des espèces d'insectes sont estimées comme sociales mais 57% des espèces hautement invasives listées par l'IUCN sont des insectes sociaux (Bertelsmeier 2021). Une des clés du succès d'invasion des hyménoptères sociaux est la capacité d'une seule reine fécondée à fonder une colonie et à produire un nombre conséquent de futurs reproducteurs et ce, pendant plusieurs années (Moller 1996). Certaines espèces, comme les fourmis, peuvent être polygynes (plusieurs reines présentes dans un seul nid), ce qui peut augmenter considérablement les chances, lors d'un transport, de déplacer un individu reproducteur capable de produire une colonie dans un nouvel environnement (Manfredini et al. 2019). De plus, les insectes sociaux sont capables de dominer l'accès aux ressources grâce à leur nombre important d'ouvrières, d'être hautement dispersifs (Moller 1996) et pour certains, des systèmes d'accouplement limitant la consanguinité (évitement des congénères pendant le vol nuptial, polyandrie) (Cornell and Tregenza 2007; Eyer and Vargo 2021). Plus généralement, leur capacité d'envahir avec succès un environnement est liée à leur flexibilité comportementale et écologique que permet la socialité (Chapman & Bourke 2001).

Chez les guêpes sociales, on retrouve des espèces invasives au sein de la sous-famille des Polistinae et des Vespinae. Parmi les espèces envahissantes de la sous-famille des Polistinae, on compte trois espèces du genre *Polistes* (Cervo et al. 2000; Parent et al. 2020; McGruddy et al. 2021). Dans la sous-famille des Vespinae, on compte trois espèces du genre *Vespula* (Thomas et al. 1990; Gambino et al.

1990; Masciocchi and Corley 2013) et quatre espèces du genre *Vespa* : *Vespa crabro* (Amérique du Nord, Shaw and Weidhaas 1956), *Vespa orientalis* (Amérique du Sud, Dvorak 2006), *Vespa velutina* (Corée du Sud, Kim et al. 2006; Europe, Haxaire et al. 2006; Japon, Sakai and Takahashi 2014), *Vespa mandarinia* (Etats-Unis, Wilson et al. 2020).

1.2. Le cas de Vespa velutina nigrithorax

L'Asie et l'Océanie comptent 22 espèces du genre *Vespa* dont deux qui sont également présentes à l'Ouest (Figure 1A) : *Vespa orientalis* (Linnaeus 1771) et *Vespa crabro* (Linnaeus 1758). *Vespa orientalis* est distribuée entre le Moyen-Orient, l'Asie centrale, le Machrek et les rivages de la mer Rouge jusqu'à la corne de l'Afrique. *Vespa crabro* est présent en Europe occidentale, en Russie d'Europe, au Nord-Ouest de la Chine, en Chine méridionale et au Japon. *Vespa velutina* (Lepeletier, 1836) est composée de 13 sous-espèces (van der Vecht 1957; Perrard et al. 2014) qui sont répandues en Asie du Sud-Est, en Chine méridionale jusqu'en Indonésie. On l'identifie également en bordure himalayenne et en Europe de l'Ouest puisque c'est une espèce invasive (Figure 1B).

La sous-espèce *Vespa velutina nigrithorax* (De Buysson 1905) est originaire de régions tempérées et subtropicales principalement de Chine méridionale et du nord du Bangladesh. C'est cette sous-espèce qui est invasive : elle a été identifiée en Corée du Sud (Busan) en 2003 (Kim et al. 2006), en France en 2004 (Villeneuve lès Agen) (Haxaire et al. 2006), et au Japon (île de Tsushima) en 2012 (Sakai and Takahashi 2014) (Figure 1A).

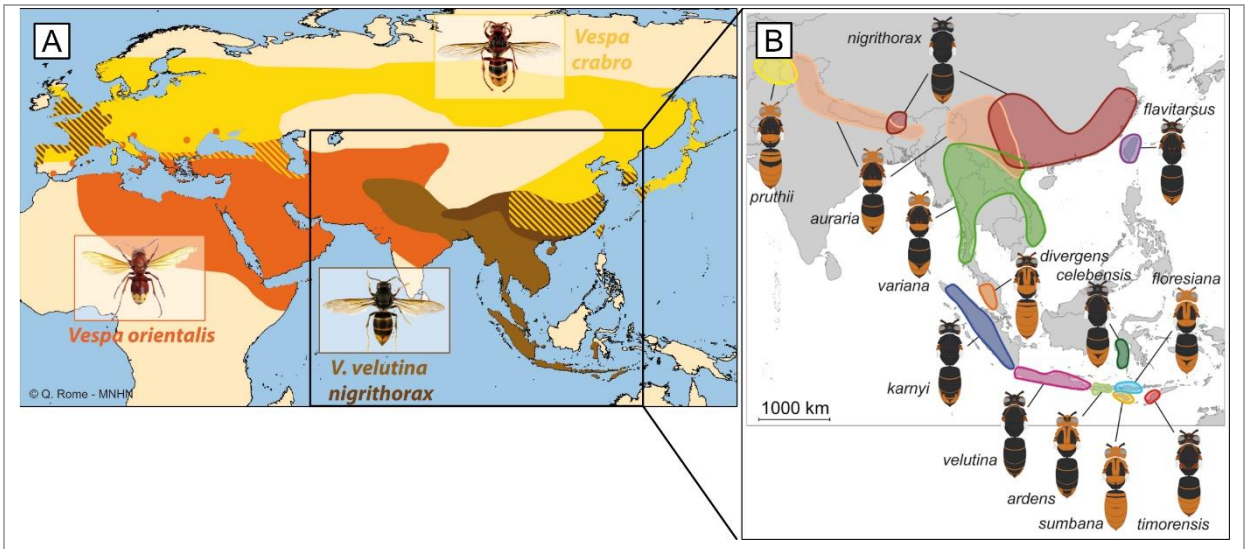


Figure 1

Carte de répartition des frelons en Europe, Asie et Afrique A) du genre Vespa, source : MNHN (https://frelonasiatique.mnhn.fr/), B) de l'espèce Vespa velutina, source : Perrard et al. 2014.

1.3. Une dispersion rapide en Europe

Depuis son invasion en Corée du Sud à Busan, *Vespa velutina,* s'est établie et dispersée vers le Nord du pays dans lequel elle est devenue l'espèce de frelon la plus abondante en remplaçant les espèces du genre *Vespa* telle que *V. simillima* (Choi et al. 2012). Des études suggèrent que le Japon continental aurait été envahi à partir de 2015 (Kitakyushu, île de Kyushu) via l'île de Tsushima (Sakai and Takahashi 2014; Takahashi et al. 2018) où *V. velutina* avait été repérée en 2012 et où elle s'était établie (Sakai and Takahashi 2014). Des analyses de séquences d'ADN mitochondrial soutiennent le scénario de l'invasion du Japon à partir de la Corée du Sud (Takeuchi et al. 2017). En effet, l'île de Tsushima est située sur une route commerciale très fréquentée entre le Japon et la Corée du Sud.

En Europe, l'invasion a été très rapide puisque le frelon s'est dispersé en moins de 20 ans dans 11 pays (Figure 2). Son introduction a eu lieu en 2004 à Villeneuve lès Agen où un premier nid a été observé (Haxaire et al. 2006). Des études génétiques suggèrent que cette invasion est issue d'un unique événement d'introduction comptant une femelle fécondée par 5 mâles en provenance des provinces

de Zhejiang et Jiangsu en Chine (Arca et al. 2015). Les introductions de frelons en France et en Corée proviennent de deux événements introductifs indépendants (Arca et al. 2015).

En France, *Vespa velutina nigirthorax* a été inscrite parmi les espèces exotiques envahissantes préoccupantes pour l'Union Européenne (réglement d'exécution 2016/1141). Plusieurs systèmes de signalement ont été mis en place dont celui du Musée d'Histoire Naturelle de Paris mais aussi celui de l'INRAe ou de structures associatives de protection des abeilles. Ces systèmes sont accessibles à chacun et permettent de centraliser les informations et faire état de la dispersion du frelon asiatique en France et en Europe. Les observateurs signalent un individu de l'espèce d'intérêt puis des cartes de répartition de l'espèce sont établies en conséquence (Figure 2).

Le frelon asiatique s'est établi en France en 2004 (Haxaire et al. 2006), puis s'est répandu en Espagne (2010, López et al. 2011), au Portugal (Grosso-Silva and Maia) en Belgique (2011, Rome et al. 2013), en Italie (2012, Demichelis et al. 2014), en Allemagne (2014, Witt 2015), en Angleterre (2016, Budge et al. 2017), Suisse (2017,), en Irlande (2021, Dillane et al. 2022), aux Pays Bas (2017, Smit et al. 2018) et au Luxembourg (2020, Ries et al. 2021). Ce sont les fondatrices qui sont responsables de la dispersion de l'espèce à l'automne lorsqu'elles quittent leur nid pour hiberner et au printemps lorsque ces dernières sortent d'hibernation et cherchent un endroit pour fonder leur colonie. Des modèles mathématiques indiquent que les transports humains ne sont pas nécessairement impliqués dans la dispersion de l'espèce en Europe. Le frelon asiatique est capable de se disperser très vite par lui-même (Robinet et al. 2017).

Des modélisations spatiales ont mis en évidence le rôle de facteurs environnementaux et anthropiques qui favorisent la dispersion du frelon dans certaines zones : les conditions climatiques (notamment les précipitations), l'abondance des proies (abeilles, source principale de nourriture) et le faible niveau de compétition interspécifique (la dispersion du frelon a été plus rapide en France qu'en Corée : elle compte six autres compétiteurs contre seulement une seule en France). La structure des sols (présence d'aires agricoles) ainsi que le niveau d'urbanisation (Choi et al. 2012) ont un effet favorable et

significatif sur la présence des frelons (Bessa et al. 2016). Les prédictions selon les scénarios climatiques de 2100 annoncent une augmentation de l'adéquation climatique à la dispersion du frelon et donc du risque d'invasion dans toute la péninsule ibérique et dans toute l'Europe centrale et orientale (Villemant et al. 2011a; Barbet-Massin et al. 2013; Bessa et al. 2016).

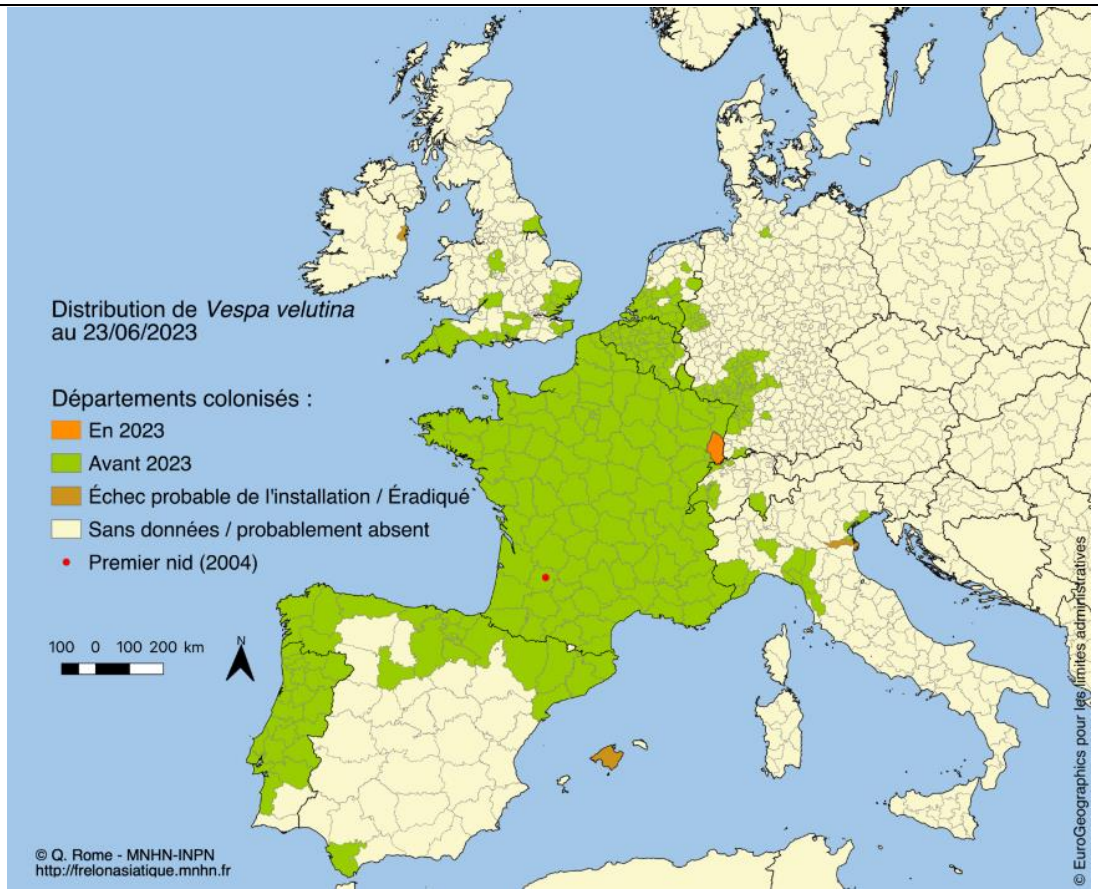


Figure 2
Carte de répartition de *Vespa velutina nigrithorax* en Europe. Source : MNHN (https://frelonasiatique.mnhn.fr/).

2. Biologie et comportement du frelon asiatique

2.1. Cycle de développement

Vespa velutina nigrithorax mesure entre 17 et 32mm de long et son corps est noir, avec de fines rayures orangées sur l'abdomen (Figure 3A). Le 4ème segment abdominal est entièrement jaune-orangé (Figure 3A). Sa tête et ses antennes sont noires et sa face est orangée (Figure 3B). Ses pattes ont les extrémités jaunes (Figure 3B), d'où son nom commun de « frelon à pattes jaunes ». Ce frelon est une espèce eusociale, c'est-à-dire qu'il vit en colonie dans laquelle il y a une unique caste reproductrice (la reine et les mâles), un chevauchement des générations d'ouvrières et une division du travail entre les individus qui la composent. Les colonies peuvent compter jusqu'à plusieurs milliers d'individus à l'automne et former des structures de plusieurs dizaines de cm de haut (Rome et al. 2015).

En Europe, le cycle du frelon asiatique à pattes jaunes est le suivant (Figure 4) : Au printemps, les femelles fécondées, fondent une nouvelle colonie (Archer 2010). Ce sont ces fondatrices qui initient la construction du nid en allant chercher des matériaux (fibres de bois) et qui prennent en charge toutes les activités intra- et extra-nidales puisqu'elles sont seules. La plupart des nids sont initiés dans des cavités, des rebords de toits, des ruchettes vides. Les fondatrices pondent les premiers œufs et s'occupent du couvain (soin, alimentation) (Figure 3C, 3D). Au début de l'été, les premières ouvrières émergent (elles seront plus petites que les ouvrières suivantes, environ 1,5 cm contre 3 cm) et prennent le relais pour toutes les activités de la colonie sauf la ponte des œufs, qui devient l'unique tâche de la reine.

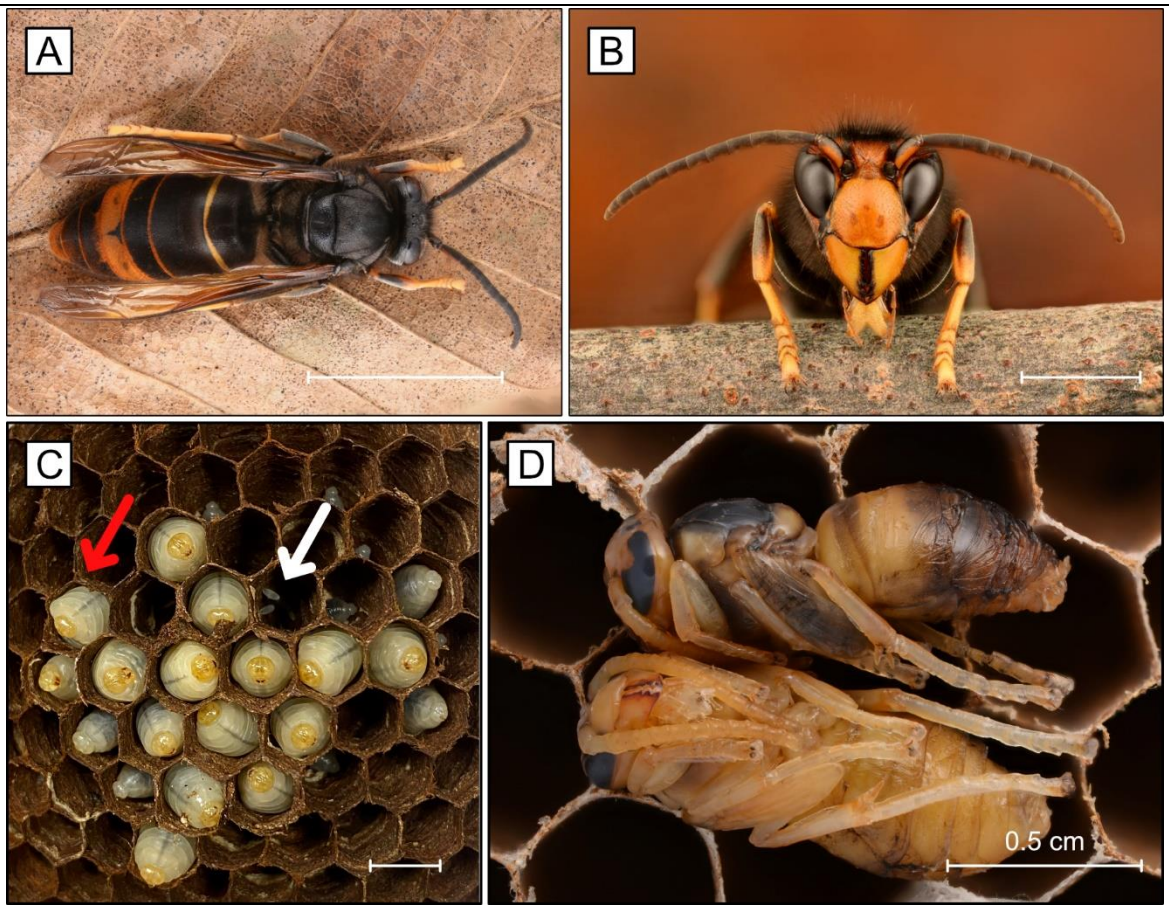


Figure 3

Stades de développement de *Vespa velutina nigrithorax*. A) Adulte en vue dorsale, source : Gilles San Martin (CC BY-SA 2.0), B) Adulte en vue frontale, source : Gilles San Martin (CC BY-SA 2.0). Barre d'échelle : 0.5 cm. C) Œufs (flèche blanche) et larves (flèche rouge) dans les alvéoles d'une galette (support du couvain), source : Zoé Tourrain , D) Nymphes, source : Gilles San Martin (CC BY-SA 2.0).

Pendant l'été, le nid primaire, construit par la reine au printemps, est souvent abandonné au profil d'un nid secondaire (70% des cas) quand le premier était trop près du sol ou dans un endroit trop confiné (Figure 5A). On les retrouve principalement dans des zones artificielles et agricoles et à plus de 10 mètres de haut. Ils sont majoritairement construits dans la végétation (87%) mais on les retrouve aussi dans des constructions (12.8%) ou, très rarement, sous terre (0.2%) (Rome et al. 2015). C'est la période de développement du nid pendant laquelle l'activité des frelons s'intensifie et la taille du nid ne cesse de croitre (Monceau et al. 2013b, 2017; Rome et al. 2015, p. 201) (Figure 5B).

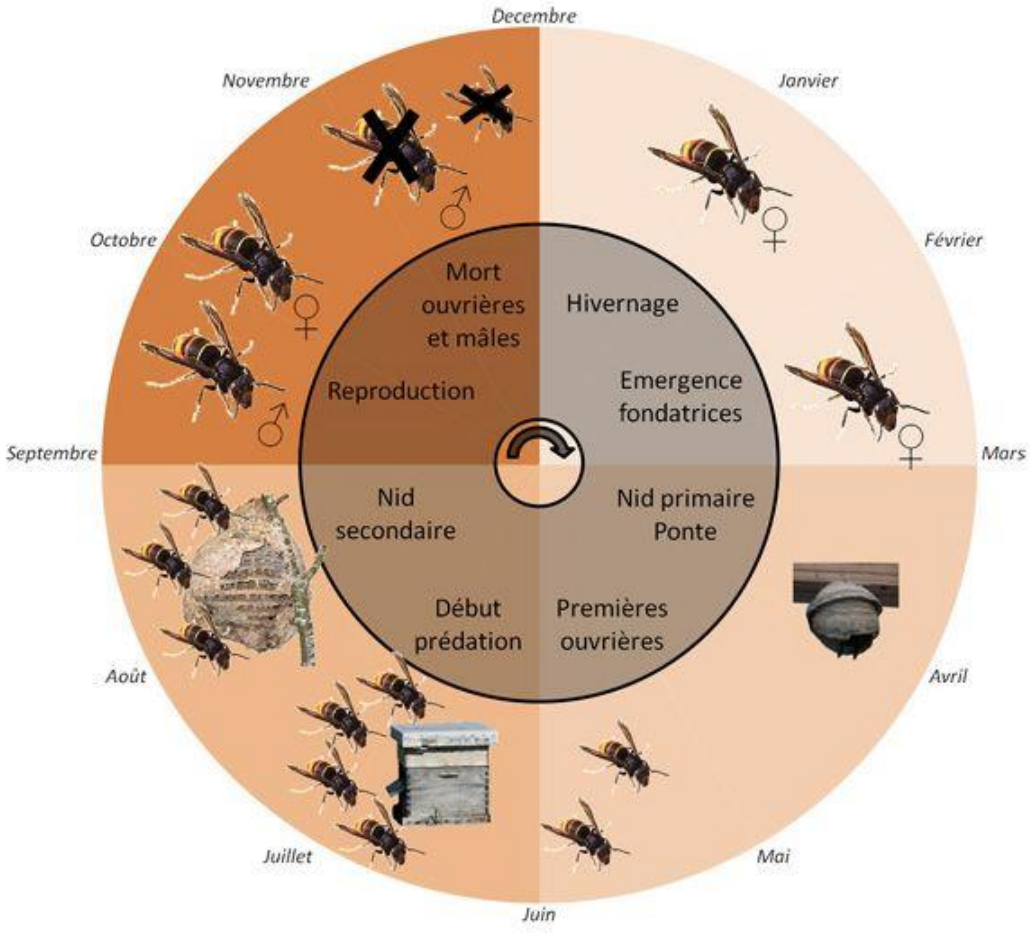


Figure 4
Cycle de développement *Vespa velutina nigrithorax* (Monceau et al. 2014)

A l'automne, les individus reproducteurs émergent et s'accouplent probablement à l'intérieur ou à proximité du nid (Matsuura and Yamane 1990; Poidatz et al. 2018a). De fin octobre à début novembre, le nid atteint sa capacité maximale : il peut contenir jusqu'à au moins 2000 ouvrières et 500 futures fondatrices. A la fin de la saison, un nid peut contenir jusqu'à 11 galettes (support du couvain) et avoir produit au total jusqu'à environ 13000 individus (Rome et al. 2015). Au fur et à mesure de l'avancée de la saison vers l'hiver, la reine, les mâles, les dernières larves et les ouvrières meurent. Les gynes, une fois fécondées, cherchent un endroit pour hiberner seule ou en petit groupe.



Figure 5
Nids de frelons asiatiques. A) Nids primaires dans un abri (gauche : nid de la saison n-1, droite : nid de la saison n), source : Pierre-Yves Quincy, B) Décrochage d'un nid de fin de saison en haut d'un toit, source : Fanny Vogelweith, C) Nid de fin de saison en haut d'un arbre (flèche rouge), source : Pierre-Yves Quincy.

2.2. Besoins nutritionnels et fourragement

Dans l'ensemble du manuscrit, le concept de fourragement (et les individus qui fourragent, les fourrageurs) fait référence à l'ensemble des comportements exprimés par un individu pour chercher, identifier et exploiter une ressource dans son environnement.

Les frelons sont des *central place foragers*, c'est-à-dire qu'ils exploitent des ressources à partir d'un nid fixe. Ils sont capables de retrouver le chemin de leur colonie dans un rayon allant jusqu'à 5 kilomètres (Poidatz et al. 2018c). Pendant la majeure partie de la saison, excepté au début du printemps, ce sont

les ouvrières qui sont responsables de la collecte de la nourriture pour l'ensemble de la colonie (Archer 2010). Elles transfèrent le produit de leur collecte par trophallaxie aux congénères et au couvain, c'est à dire, en régurgitant le matériel liquide absorbé et le contenu dans leur jabot. Les larves sont principalement nourries avec des proies broyées par les ouvrières et du nectar (Bouchebti et al. 2022). Les adultes se nourrissent de nectar (Bouchebti et al. 2022) et du produit de la régurgitation des larves. Les larves étant nourries de proies, elles restituent aux adultes les produits de dégradation des protéines sous forme de sécrétions contenant des glucides simples et des acides aminés libres (Sorensen et al. 1983; Meurville and LeBoeuf 2021).

Afin de satisfaire les besoins nutritionnels de l'ensemble de la colonie, les frelons collectent des protéines, du miellat, du miel ou du nectar de fleurs (Richter 2000). Leurs activités de fourragement démarrent le matin, atteignent un pic vers midi et décroissent tout au long de l'après-midi pour s'interrompre totalement le soir (Monceau et al. 2017). La plupart des vols effectués durent moins d'une heure (Poidatz et al. 2018c).

Pour collecter des protéines, les frelons chassent plusieurs espèces d'insectes. Ce sont des prédateurs généralistes : leur proie favorite est l'abeille domestique (*Apis mellifera*) (Verdasca et al. 2022) mais ils chassent également des mouches et des guêpes sociales ainsi qu'un large spectre d'autres organismes (plus de 159 espèces identifiées sur un suivi de 16 nids et de 2151 boulettes) (Rome et al. 2021). En fonction de l'habitat dans lequel se trouve le nid, le régime alimentaire d'une colonie est composé de 33 à 66% d'abeilles (Villemant et al. 2011b). Plus les nids de frelons sont en zones artificielles, plus ils se nourrissent d'abeilles domestiques car il s'agit d'une proie abondante (Villemant et al. 2011b). Le frelon chasse en volant devant les ruches ou près de certaines espèces florales pendant que ses proies les visitent, principalement des abeilles et des mouches (Ueno 2015; Rojas-Nossa and Calviño-Cancela 2020a). Le taux de succès de chasse des frelons est variable selon les espèces attaquées (3,4-50%) (Rojas-Nossa et al. 2023). Pour repérer les ruches et leurs futures proies, les frelons utilisent des indices olfactifs émanant du stockage de miel et de pollen (Couto et al. 2014). Une fois

leur site de chasse repéré, ils se positionnent en face de l'entrée des ruches en vol stationnaire, et capturent les abeilles qui rentrent à la ruche (Figure 6A). On suppose que les abeilles, alourdies à leur retour à la ruche par le pollen et le nectar collectés, ont moins de manœuvrabilité pour échapper au prédateur (Monceau et al. 2013a). Plus les frelons sont nombreux devant les ruches, plus le nombre d'abeilles capturées par individu augmente (Figure 6B). Lorsque la densité de frelons devant une ruche atteint un certain seuil (9, Monceau et al. 2013a), le nombre de captures diminue. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène, la première implique des comportements agonistiques que l'on observe entre les frelons, qui augmenteraient avec la densité de frelons et réduiraient le temps alloué à la chasse. La seconde hypothèse suggère que certains frelons sont devant les ruches exclusivement pour garder ces sites de chasse pendant que d'autres frelons chassent effectivement les abeilles (Monceau et al. 2013a).

Pour collecter du nectar, les frelons fourragent sur des fleurs (Figure 6C) : au Japon, ils ont été observés en train de fourrager sur 27 espèces florales appartenant à 15 familles (Ueno 2015). Une étude témoigne de plusieurs comportements chez le frelon qui révéleraient leur potentiel pollinisateur : 1) des visites répétées ou séquentielles ont été observées sur des mêmes espèces de plantes au cours d'un unique trajet, 2) du pollen des fleurs visitées était présent sur le corps du fourrageur, 3) des expériences de captures, recaptures ont permis de mettre en évidence que les frelons revenaient sur des lieux précédemment visités pour visiter à nouveau les mêmes espèces florales (Ueno 2015).

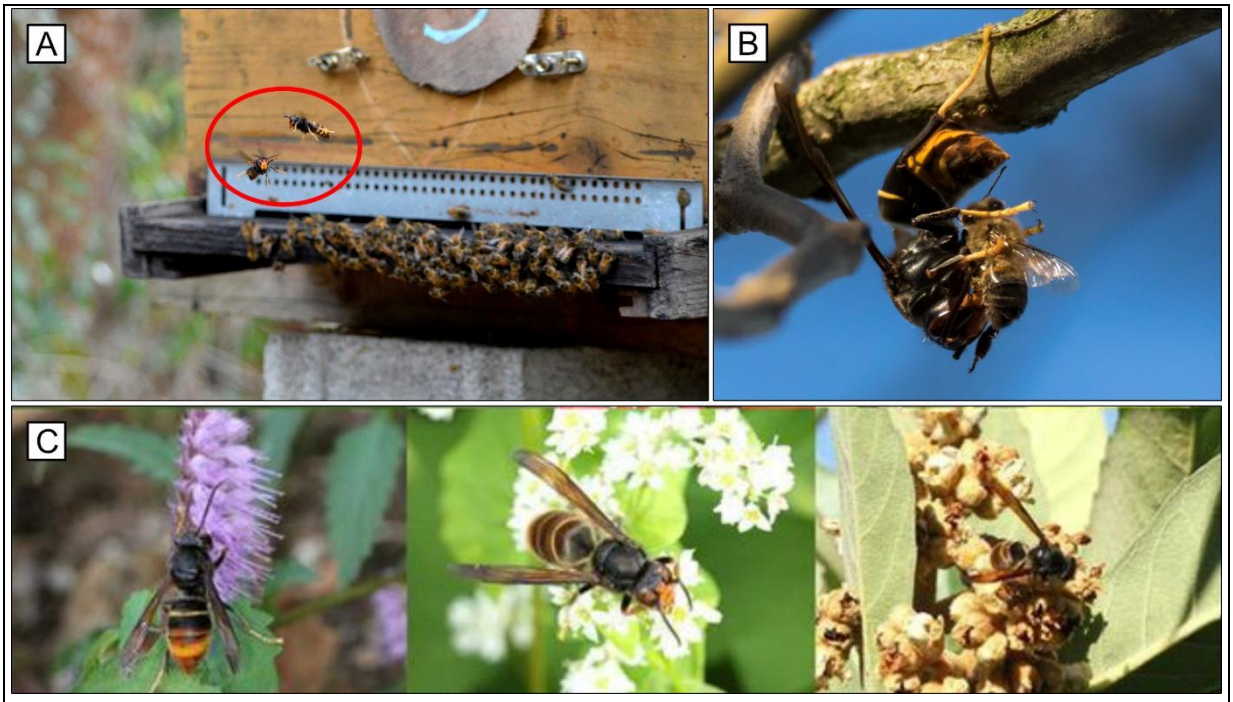


Figure 6
Ouvrières de *Vespa velutina nigrithorax* en situation de fourragement. A) Devant une ruche d'abeilles domestiques, pour capturer les abeilles de retour à leur colonie, source : Tamara Gomez-Moracho. B) Capture d'une abeille et découpe de son corps pour ne conserver le plus souvent que le thorax, source : fra298 (CC BY-NC-ND 2.0) , C) Sur des fleurs, pour accéder à leurs nectars (Ueno 2015).

2.3. Impact de sa présence en Europe

2.3.1. Ecologique

La présence du frelon asiatique en Europe contribue à la diminution des populations d'abeilles domestiques (Laurino et al. 2019) qui sont déjà fragilisées par les activités anthropiques (Goulson et al. 2015). Une faible pression de prédation devant les ruches diminue la taille des populations d'abeilles alors que lorsque la prédation est forte, cela induit une paralysie des comportements de fourragement et une surconsommation des réserves en miel (Requier et al. 2019). En effet, le nombre d'abeilles sur le plateau d'envol augmente avec le nombre de frelons présents devant le ruche, ce qui diminue l'activité de fourragement (Monceau et al. 2018). La probabilité de survie hivernale diminue (Requier et al. 2019). De plus, la présence des frelons devant les ruches induit un stress oxydatif chez les abeilles pouvant entraîner une altération des fonctions cellulaires et donc impacter négativement la santé des abeilles (Leza et al. 2019).

Bien que les frelons s'alimentent principalement d'abeilles domestiques, ils s'attaquent également à d'autres espèces d'insectes (Villemant et al. 2011b), ce qui questionne leur impact dans les écosystèmes et sur les pollinisateurs natifs. Malgré le fait que plusieurs études s'accordent sur la diversité des espèces capturées par le frelon asiatique, les avis divergent sur l'interprétation de ce constat. Pour certains auteurs, cela témoigne d'un potentiel risque important pour les espèces sauvages puisque le frelon asiatique s'attaque à des espèces de différents ordres et familles (Verdasca et al. 2022). Pour d'autres, l'observation que seules 0.02% des abeilles capturées sont sauvages et que plus de 159 espèces de proies ont été identifiées suggèrerait que leur impact serait mineur sur les espèces sauvages puisque leur régime est varié (Rome et al. 2021).

A ma connaissance, seules deux études ont testé l'effet de la présence du prédateur dans un environnement sur l'activité de fourragement des espèces pollinisatrices. La première étude démontre que la présence de frelons sur un patch de fleurs (*Mentha suaveolens)* réduit le taux et la durée de visites de certains espèces pollinisatrices (Apidae et Syrphidae) et diminue la quantité de pollen de conspécifiques sur le stigma des fleurs (Rojas-Nossa and Calviño-Cancela 2020a). La seconde étude, plus récente, démontre que dans les zones où le frelon se trouve en forte abondance, la fréquence et la durée de visites des fleurs (*Hedera hibernica*) par certains pollinisateurs est altérée et que le frelon devient le visiteur le plus commun de ces fleurs (Rojas-Nossa et al. 2023). Il semblerait que le frelon asiatique soit un pollinisateur moins efficaces que les espèces natives puisque le taux de reproduction de ces espèces à fleurs est dégradé dans ces zones (Rojas-Nossa et al. 2023). Bien que ces études soient difficilement généralisables puisqu'elles sont restreintes à deux seules espèces florales et à une unique zone en Espagne, il semblerait que le frelon exerce un impact négatif sur l'activité de fourragement des pollinisateurs natifs et sur la pollinisation des espèces florales.

Les espèces natives ou naturalisées peuvent souffrir de la prédation du frelon asiatique mais également de leur compétition dans le cas des espèces qui partagent la même niche. C'est le cas du

frelon européen (*Vespa carbro*) puisque les deux espèces ont un chevauchement de leur niche écologique (Cini et al. 2018) et de leur phénologie saisonnière (Monceau et al. 2015a). De plus, les frelons asiatiques ont un plus haut potentiel reproducteur (Poidatz et al. 2018a) et une plus forte activité, caractérisée par des comportements plus audacieux et plus exploratoires (Monceau et al. 2015b) que le frelon européen. Ces traits pourraient exacerber la compétition entre les deux espèces de frelons (*V. velutina et V. crabro*). Cependant, une étude de surveillance à grande échelle dans un environnement où *V. velutina* s'est installé récemment et dans laquelle elle est encore peu abondante n'a décelé aucun impact négatif de sa présence sur l'abondance de trois espèces de Vespidae (*V. crabro, Vespula vulgaris, Vespula germanica*) (Carisio et al. 2022). A ma connaissance, aucune étude similaire n'a été réalisée dans les zones envahies plus anciennement et dans lesquelles le frelon asiatique est plus abondant.

2.3.2. Economique et sanitaire

A l'échelle nationale et dans un scénario de prédation forte, le risque de mortalité des colonies d'abeilles lié au frelon pourrait atteindre 29,2% par an du cheptel des apiculteurs. Le coût de la perte des colonies s'élèverait à 30 millions d'euros tandis que les apiculteurs consacreraient 26,6% de leurs revenus issus du miel pour le remplacement de leur cheptel (Requier et al. 2022). En plus des impacts économiques directs sur le secteur de l'apiculture, la présence du frelon génère également des coûts pour développer des méthodes de contrôle des populations et de destruction des nids. On considère que les activités de lutte menées en France entre 2006 et 2015 ont coûté environ 23 millions d'euros (Barbet-Massin et al. 2020).

Lorsqu'ils se sentent menacés, les frelons défendent leur colonie en projetant du venin ou en piquant l'intrus et, de ce fait, deviennent de potentielles sources de danger. Des comportements de défense peuvent avoir lieu dès une approche de 3 mètres du nid et jusqu'à 300 mètres et préférentiellement sur des cibles de couleur noire (Choi 2021). Les cas d'attaques par le frelon asiatique sont donc accidentels. Dans le cas d'attaque, les projections de venin ou piqûres peuvent entraîner des lésions oculaires ou des réactions allergiques qui peuvent dans certains cas, entraîner la mort de l'individu

attaqué (Vidal et al. 2019; Vidal 2022). Une revue des données enregistrées par le Centre AntiPoison, Toxicovigilance France souligne l'absence de corrélation entre l'augmentation des populations de *V. velutina* et le nombre de piqûres d'Hyménoptères pendant la phase d'initiation de l'invasion (de Haro et al. 2010).

3. La lutte contre le frelon asiatique : méthodes existantes et limites

Pour toutes les raisons citées plus haut, plusieurs méthodes de lutte ont été mises en place afin de réguler les populations de frelons invasifs. La grande majorité des méthodes actuelles de contrôle de *V. velutina* sont chimiques ou physiques/mécaniques bien qu'il existe aussi des méthodes de lutte récentes et alternatives ainsi que des mesures préventives mises en œuvre à l'échelle européenne (élaboration de listes rouges, énoncés précédemment). L'ensemble des moyens de lutte visent, soit à détruire les nids, soit à diminuer la pression de prédation devant les ruches en ciblant des ouvrières isolées.

3.1. Destruction des nids

Pour détruire les nids de frelons, le dioxyde de soufre (SO_2) a été le premier produit utilisé par les professionnels. Ce produit était injecté à l'aide d'une perche directement dans les nids et avait pour effet d'intoxiquer les adultes et de congeler le couvain. Son utilisation a été interdite par la directive européenne 98/8/CE et la France, suite à une demande (ANSES 2013), a pu bénéficier d'une autorisation dérogatoire de 2013 à 2014 non renouvelée depuis.

A présent, pour détruire les nids, les insecticides à base de perméthrine ou de pyrèthre sont utilisés et provoquent la mort immédiate de l'insecte visé. Les bombes à grandes portées composées de ces insecticides sont principalement utilisées pour le traitement d'individus isolés ou de jeunes nids. Ces insecticides sont également disponibles sous forme de poudre et sont répandus dans des nids matures à l'aide de perches par des professionnels. Un certificat biocide est nécessaire pour traiter les nids. Leur décrochage après traitement est obligatoire afin de réduire l'impact de ces produits sur l'en-

vironnement puisqu'ils sont rémanents. Plus récemment, la terre de diatomée (algue unicellulaire microscopique) qui entraîne des lésions du tube digestif des insectes, est également utilisée (sous forme de poudre). De nouvelles méthodes telles que l'injection de vapeur dans les nids est en cours d'étude et de développement.

Le principal frein à ces méthodes visant à détruire les nids de frelons repose sur la difficulté à localiser les nids puisqu'ils sont le plus souvent cachés dans le feuillage des arbres. Pour cela, il est possible de les localiser par l'intermédiaire d'une fourrageuse capturée et équipée d'une antenne afin de suivre sa trajectoire par radio-tracking (Kennedy et al. 2018) ou à l'aide d'un radar harmonique (Maggiora et al. 2019; Lioy et al. 2021b). Il est également possible de localiser les nids avec une caméra thermosensible du fait de la chaleur qu'ils dégagent (Lioy et al. 2021a). Lorsque les nids ont été identifiés, des professionnels peuvent le retirer (coût estimé de 60 euros à 180 euros en fonction du nid, sur la base de la consultation des prix tarifaires de trois sites internet proposant ces tarifs). L'utilisation de ces outils et le retrait des nids sont chronophages, onéreux pour certains et nécessitent une formation particulière. De plus, bien que l'application soit ciblée, l'utilisation d'insecticides non-sélectifs pour détruire les nids est dangereux pour la biodiversité puisqu'ils sont hautement toxiques.

3.2. Réduction du nombre d'individus

Pour réduire le nombre d'individus, les méthodes de lutte physiques/mécaniques utilisées sont très variées et visent à capturer les reines ou les ouvrières ou encore à maintenir les frelons éloignés des ruches. Dans le même objectif, on compte également l'utilisation de lutte chimique par phéromones. Les méthodes d'application sont très diverses. J'ai décrit l'ensemble de ces méthodes et leurs particularités dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1
Méthode de lutte pour réduire le nombre d'ouvrières ou de reines *V. velutina*

Objectif	**Méthodes**	**Emplacement**	**Principe**	**Limites**
Cibler et capturer individus isolés	Pièges	Rucher	Pièges de type Smartrap©, Vétopharma© ou Jabeprode contenant un appât attractant (sucré : sirop ; protéiné : viande, poisson ; produits de la ruche : vieille cire) pour piéger reines ou ouvrières selon période de pose. Recherches en cours pour utiliser des phéromones attractives et sélectives (Cheng et al. 2022).	Peu efficaces contre le développement des colonies de frelons (Monceau et al. 2012) et piègent un nombre conséquent d'insectes non cibles puisqu'ils ne sont pas sélectifs (Monceau et al. 2012; Lioy et al. 2020).
	Harpes électriques	Entre ruches	Les frelons se déplacent parallèlement pour passer d'une ruche à l'autre. En se déplaçant, les ailes des frelons touches les fils électrifiés de la harpe. Le frelon tombe dans un bac à eau disposé sous la harpe.	Limitent la prédation des frelons sur les ruches et leurs conséquences sur les activités de fourragement mais ne les éliminent pas complétement (Rojas-Nossa et al. 2022).
	Raquette badminton	Devant ruches	Elimination des frelons uns par uns en leur assénant un coup de raquette.	Très dangereux (risque de piqûre par abeilles et frelons) car action proche des ruches, chronophage (rester en permanence devant les ruches), peu efficace (peu d'ouvrières touchées)
	Plante carnivore	Rucher	Capture et se nourrit des frelons asiatiques.	Attirent plus de Diptères et d'autres taxa que les frelons asiatiques (Wycke et al. 2018).
Eloigner les individus des ruches	Muselière	Autour ruches	Une muselière entoure la ruche ou plusieurs ruches. Les mailles sont suffisamment fines pour que les abeilles passent mais pas les frelons. Permet de les maintenir à distance des ruches.	Limite l'impact des frelons sur l'activité des abeilles mais ne réduit pas le nombre de frelons présents ni leur succès de chasse (Bonnefond et al. 2021). Pas de preuves de leur efficacité à long terme.
	Peignes	Sur ruches	Peignes placés sur le plancher d'envol de la ruche, au niveau de son entrée. Les mailles du peigne ne laissent passer que les abeilles et empêchent les frelons d'entrer dans la ruche.	Ne limite pas l'impact de la présence des frelons sur les abeilles

4. Objectifs de la thèse

Les méthodes de lutte existantes présentent chacune une ou plusieurs limites dans leur utilisation, soit à cause de leur manque d'efficacité, soit à cause de leur impact négatif sur la biodiversité, soit du fait de la difficulté de trouver des nids. Ces aspects soulignent l'intérêt et le besoin de développer de nouvelles méthodes de lutte, plus sélectives et plus efficaces contre *V. velutina.* Le raffinement des méthodes de lutte pourrait s'envisager à plusieurs échelles, allant de la prévention des zones encore inoccupées par le frelon, à l'amélioration de l'efficacité de méthodes existantes ou la proposition de nouvelles.

L'objectif principal de ma thèse CIFRE était de proposer de nouvelles méthodes de lutte contre le frelon asiatique. Pour répondre à ces objectifs, j'ai utilisé des approches complémentaires permettant la compréhension des mécanismes de dispersion de l'espèce (Chapitre 1) et des comportements de fourragement (Chapitre 2), ces deux points étant intimement liés. J'ai également proposé de nouveaux outils pour l'étude expérimentale du comportement du frelon asiatique (Chapitre 3). Enfin, j'ai testé l'utilisation d'un entomopathogène comme biocontrôle contre le frelon (Chapitre 4).

4.1. Comprendre les mécanismes de dispersion

Comprendre les *patterns* de dispersion du frelon asiatique en Europe et ce qui a permis sa rapidité d'expansion nous est apparu comme une priorité pour détailler les modèles mathématiques de dispersion de l'espèce principalement centrés sur l'effet du climat et de l'urbanisation sur la distribution du frelon (Villemant et al. 2011a; Choi et al. 2012; Bessa et al. 2016). Ces informations permettront de mieux anticiper l'arrivée de cette espèce invasive dans des zones encore inoccupées. De ce fait, dans le Chapitre 1, je me suis intéressée aux déterminants morphologiques qui ont pu favoriser l'expansion du frelon asiatique en Europe.

4.2. Comprendre les comportements de fourragement

Les comportements de fourragement des frelons asiatiques sont fortement liés à leurs capacités dispersives. En effet, pour qu'une espèce puisse se disperser dans un nouvel environnement, il faut qu'elle

soit capable d'identifier et d'exploiter les ressources présentes pour survivre et se reproduire (Blackburn et al. 2011). A ma connaissance, aucune étude n'a encore identifié les stimuli visuels et sociaux que pourraient utiliser les frelons pour identifier un site de fourragement de type nectar bien que cette ressource soit indispensable à leur survie (Bouchebti et al. 2022). Le Chapitre 2 répond à cet objectif et est divisé en deux parties : la première vise à tester les capacités d'apprentissage de stimuli visuels et la flexibilité cognitive des frelons. La seconde vise à tester l'utilisation d'informations sociales pour trouver un site de fourragement. Une meilleure compréhension de l'utilisation des stimuli présents dans l'environnement par les frelons pourrait permettre d'améliorer les pièges existants ou proposer de nouveaux moyens de lutte qui exploiteraient les comportements naturels des frelons.

L'étude du comportement des frelons asiatiques dans leur environnement naturel est limitée par le manque d'outils. Dans le Chapitre 3, nous avons dans un premier temps testé l'utilisation d'un outil radar pour suivre la trajectoire d'un ou plusieurs frelons en mouvement. Ensuite, par praticité, nous avons utilisé un modèle bourdon pour déterminer si les ondes radars pouvaient impacter le comportement naturel des insectes suivis. Ce radar pourra également être utilisé pour détecter plus facilement les nids de frelons.

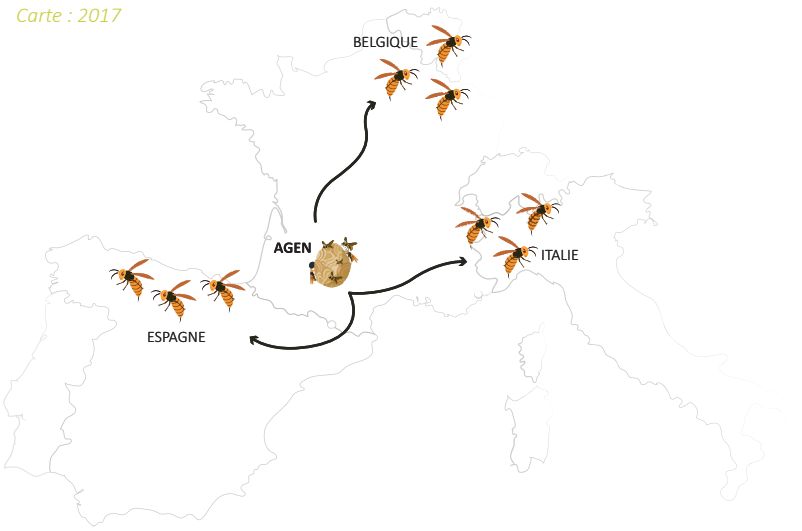
4.3. Proposer une méthode de lutte biologique

Les méthodes de destruction des nids utilisées actuellement font usage d'insecticides, nocifs pour la biodiversité. Pour réduire les effets négatifs sur les espèces non cibles, nous avons exploré l'utilisation d'une méthode de lutte biologique par entomopathogène (*Metarhizium robertsii*), déjà proposée en 2018 (Poidatz et al. 2018b). Dans le Chapitre 4, nous nous sommes intéressés à trois axes de recherche : 1) les effets létaux de l'entomopathogène sur les espèces cibles et non cibles, 2) les effets du parasite sur la locomotion des frelons asiatiques, 3) les potentiels mécanismes de défense utilisés par les espèces non cibles exposées au champignon, via leur alimentation. L'étude des comportements de fourragement proposée dans les chapitres 2 et 3 pourraient permettre de proposer différents modes d'application de cette solution.

Chapitre 1

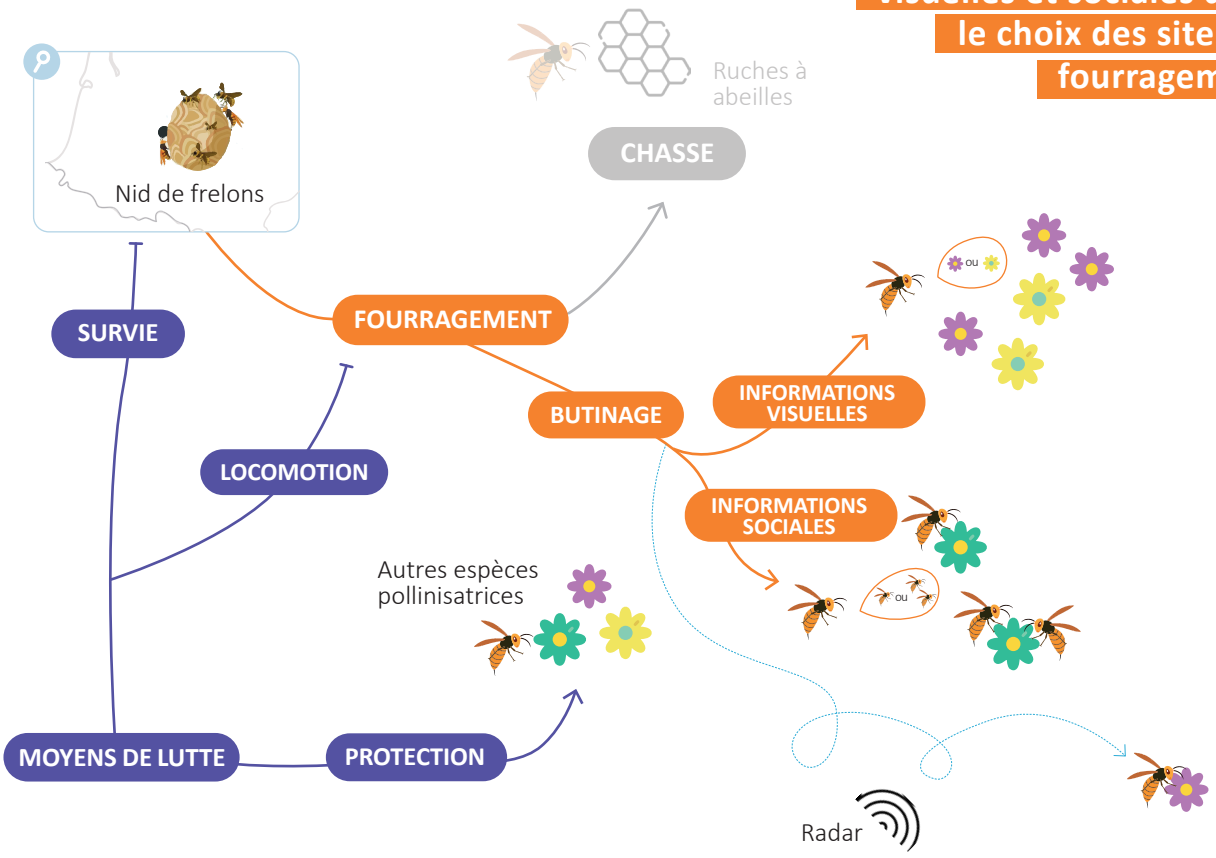
Différenciations des profils alaires de frelons asiatiques sur le front d'invasion européen

Carte : 2017



Chapitre 2

Utilisation d'informations visuelles et sociales dans le choix des sites de fourragement



Chapitre 4

Exploration et développement d'une solution de biocontrôle

Chapitre 3

Evaluation d'un outil radar pour suivre les trajectoires de vol et détecter les nids de frelons

Graphisme : Marielle Planques

CHAPITRE 1 : DIFFÉRENCIATION DES PROFILS ALAIRES DES FRELONS ASIATIQUES SUR LE FRONT D'INVASION EUROPÉEN

RÉSUMÉ

En 2004, le frelon asiatique à pattes jaunes a été accidentellement introduit en Europe et s'est répandu dans 10 pays en moins de 20 ans. Dans le contexte actuel de biocontrôle, comprendre les mécanismes responsables de cette expansion fulgurante est nécessaire pour prédire les dynamiques d'invasions futures. Ici, nous avons testé l'hypothèse du tri spatial (*spatial sorting*) : un processus qui sélectionne les individus spatialement et qui accentue les traits dispersants sur le front d'invasion sans leur conférer d'avantage sélectif. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré des fondatrices de frelons asiatiques (invasifs) et européens (non invasifs) échantillonnées dans plus de 150 communes de 5 pays, puis nous avons comparé leurs morphologies en fonction du lieu de capture. Sur le front d'invasion, les frelons asiatiques ont des ailes plus longues caractérisées par un grand *aspect ratio* (rapport entre la longueur et la surface de l'aile) que celles des frelons capturés dans la zone d'introduction, leur conférant vraisemblablement de meilleures capacités de dispersion. Ces différences morphologiques sont influencées par le lieu de capture mais également par le climat et ne sont pas observées chez les frelons européens. Bien que nous disposions de peu de données pour le tester, ces traits dispersants ne semblent pas conférer d'avantages reproductifs. L'ensemble de nos résultats suggère donc que les variations morphologiques observées chez les frelons asiatiques sur le territoire européen sont le résultat d'un tri spatial.

CHAPITRE 1 : DIFFÉRENCIATION DES PROFILS ALAIRES DES FRELONS ASIATIQUES SUR LE FRONT D'INVASION EUROPÉEN

CONTRIBUTIONS

Lacombrade Mathilde[1234*], Louise Riotte-Lambert[5*], Cristian Pasquaretta[1], Albéric Germain[1], Tamara Gomez-Moracho[1], Occiane Fousset[1], Juliette Poidatz[6], Denis Thiéry[2], Antoine Wystrach[1], Mathieu Lihoreau[1]

[1] Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Integrative (CBI); Université Paul Sabatier - Toulouse III, France

[2] UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRAe, F-33883 Villenave d'Ornon, France

[3] M2i Biocontrol, 370 route de Caunézil, 46140 Parnac, France

[4] Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Université de Toulouse, CNRS, INPT, Toulouse, France

[5] CEFE, CNRS, Univ Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier, France

[6] CIRAD, ST Pierre de la Réunion

*co-premières auteures

DT, AW and MLi ont mis en place le design expérimental de cette étude. Tous les participants du programme de science participative EUROFRELON ont capturé des frelons. MLa, AG, TG-M, CP, JP, AW and MLi ont collecté les données. MLa, LR-L, CP et AG ont analysé les données.

J'ai présenté ces résultats sous forme de communications orales à deux congrès, l'un international, l'autre européen :

- **Lacombrade et al. 2022**, A citizen science project: Studying the invasion mechanisms of the Asian hornet in Europe, *International Congres for International Union for the Study of Social Insects (IUSSI) 2022,* 3-7 juillet 2022, San Diego, Californie, Etats-Unis
- **Lacombrade et al. 2021**, Morphological correlates of dispersal capacities in the Yellow-legged hornet, *European Congres for IUSSI 2021, 7 octobre 2021,* conference virtuelle (covid)

INTRODUCTION

Les invasions biologiques peuvent causer de nombreux problèmes écologiques, économiques et de santé humaine (Simberloff et al. 2013). Le commerce international (Hulme 2021) et le changement climatique (Bellard et al. 2013) sont les principaux facteurs favorisant l'introduction d'espèces dans de nouvelles zones géographiques. Nombre de ces espèces ne parviennent pas à s'établir (Blackburn et al. 2011). En revanche, quand elles y parviennent, l'invasion peut être particulièrement rapide, favorisée par l'apparition d'individus aux phénotypes très dispersants au front de l'invasion (Phillips et al. 2008; Ochocki and Miller 2017).

Ces nouveaux phénotypes sur le front d'invasion peuvent émerger par sélection naturelle si les traits favorisant la dispersion donnent un avantage sélectif aux animaux sur le front d'invasion (Shine et al. 2011). Alternativement, ces variations morphologiques peuvent être causées par un « tri spatial » (*spatial sorting*) par lequel les individus les plus dispersants au front d'invasion se reproduisent entre eux et produisent une descendance porteuse de traits encore plus dispersants, même en l'absence d'avantage sélectif lié à ces traits (Shine et al. 2011). Ces deux processus, non mutuellement exclusifs, prédisent une accélération de la vitesse de progression du front d'invasion dans lesquelles les populations sont dominées par des individus aux morphes très dispersants. Pour distinguer ces processus opérants, il est nécessaire de s'intéresser aux avantages sélectifs, tels que la survie ou la reproduction, que confèrent ces traits dispersants et que seule la sélection naturelle devrait favoriser. Si ces traits sont corrélés négativement, ou ne sont pas corrélés, au taux de dispersion, alors c'est le tri spatial qui est en cause. C'est le cas, par exemple, du crapaud buffle (*Rhinella marina*) en Australie, où les individus sur le front d'invasion ont des pattes arrières plus longues, une meilleure endurance et se dispersent plus loin dans l'environnement que les individus de la zone du lieu d'introduction (Shine et al. 2011; Rollins et al. 2015). Ce phénotype dispersant représente un désavantage sélectif pour les crapauds qui en sont porteurs puisqu'ils causent des lésions de leur colonne vertébrale (Brown et al. 2007) et augmentent leur mortalité (Phillips et al. 2008). Dans ce système, c'est donc le tri spatial qui accélère la dispersion.

Bien que la théorie du tri spatial soit bien développée, il existe peu d'exemples chez les animaux (criquets, Simmons and Thomas 2004 ; papillons, Hughes et al. 2007 ; fourmis, Léotard et al. 2009). La présence du frelon à pattes jaunes (*Vespa velutina nigrithorax*) à travers l'Europe est un cas frappant d'invasion-éclair toujours en cours qui offre une opportunité unique pour tester cette hypothèse. Ce frelon asiatique a été accidentellement introduit dans le Sud-Ouest de la France en 2004 (Haxaire et al. 2006) et il est maintenant établi dans 11 pays. Sa présence pose de nombreux problèmes économiques (Barbet-Massin et al. 2020) et écologiques (Monceau et al. 2014; Rojas-Nossa and Calviño-Cancela 2020b; Rojas-Nossa et al. 2023) puisque son régime alimentaire est principalement constitué d'abeilles domestiques (Villemant et al. 2011b). Des études récentes ont montré que ces frelons invasifs sont présents dans des zones caractérisées par des hauts niveaux de précipitation, ce qui suggère que le taux d'expansion serait plus propice le long des côtes (Villemant et al. 2011a; Bessa et al. 2016). Les précipitations, la température ainsi que la structure de l'habitat liée à l'activité humaine (degré d'urbanisation, présence de terres agricoles) exercent une forte influence sur la distribution des frelons (Choi et al. 2012; Bessa et al. 2016). Bien que des modèles permettent de prédire et de comprendre la distribution des frelons dans de nouveaux environnements, ils ne permettent pas de prendre en compte leur dynamique d'expansion et leur rapidité. Au vue des conséquences sociétales engendrées par ce frelon, comprendre ses mécanismes de dispersion est un enjeu majeur pour prédire les mouvements de population et anticiper son arrivée sur de nouveaux territoires par des actions préventives de biocontrôle.

Dans cette étude, nous avons fait l'hypothèse que la rapidité d'expansion du frelon asiatique en Europe était liée à un phénotype dispersant présent chez les fondatrices, engendré par un tri spatial sur le front d'invasion. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé la morphologie de frelons collectés dans toute l'aire de distribution européenne. Nous nous sommes concentrés sur des fondatrices échantillonnées au printemps, puisque ce sont elles qui sont responsables de la dispersion de l'espèce (Tabadkani et al. 2012; Rome et al. 2013).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Echantillonnage

Nous avons collecté des fondatrices de frelons aux printemps 2017 et 2020 grâce à un projet de science participative dédié : EUROFRELON (https://sites.google.com/site/eurofrelon/home/eurofrelon-francais). Nous avons demandé à des volontaires de capturer des frelons (grâce à un piège à appât contenant un mélange de sirop et d'alcool) pendant une semaine (de début mars à fin mai) et de nous envoyer les frelons capturés par la poste. Les participants devaient renseigner la date de capture ainsi que les coordonnées GPS de l'emplacement de leurs pièges. Nous avons collecté plus de 5000 frelons à pattes jaunes (*Vespa velutina nigrithorax*) et 300 frelons européens (*Vespa crabro*) grâce à plus de 400 volontaires à travers l'Europe. Une fois reçus et triés, nous les avons conservé au congélateur (-18°C) pour les analyses morphologiques.

Nous avons travaillé sur un sous échantillonnage de l'ensemble des frelons capturés (Figure 7). Nous avons étudié en priorité des populations de frelons capturés dans la zone d'introduction ainsi que sur les fronts d'invasions, correspondants aux zones d'établissement les plus récentes (ici, 3 fronts : Nord, Italien, Ibérique). Nous avons sélectionné entre 4 et 59 frelons asiatiques par commune et par année de capture. Ce minimum a été fixé de manière à ne pas exclure un trop grand nombre de communes dans lesquelles nous avons obtenu peu de captures. Nous avons échantillonné plusieurs communes dans lesquelles nous avons utilisé le maximum d'échantillons disponibles (jusqu'à 59) afin d'avoir une meilleure représentation des populations communales. Le nombre de captures de frelons européens étant bien inférieur à celui des frelons asiatiques, nous avons sélectionné le maximum de frelons européens capturés par commune (de 1 à 30) (Figure 7).

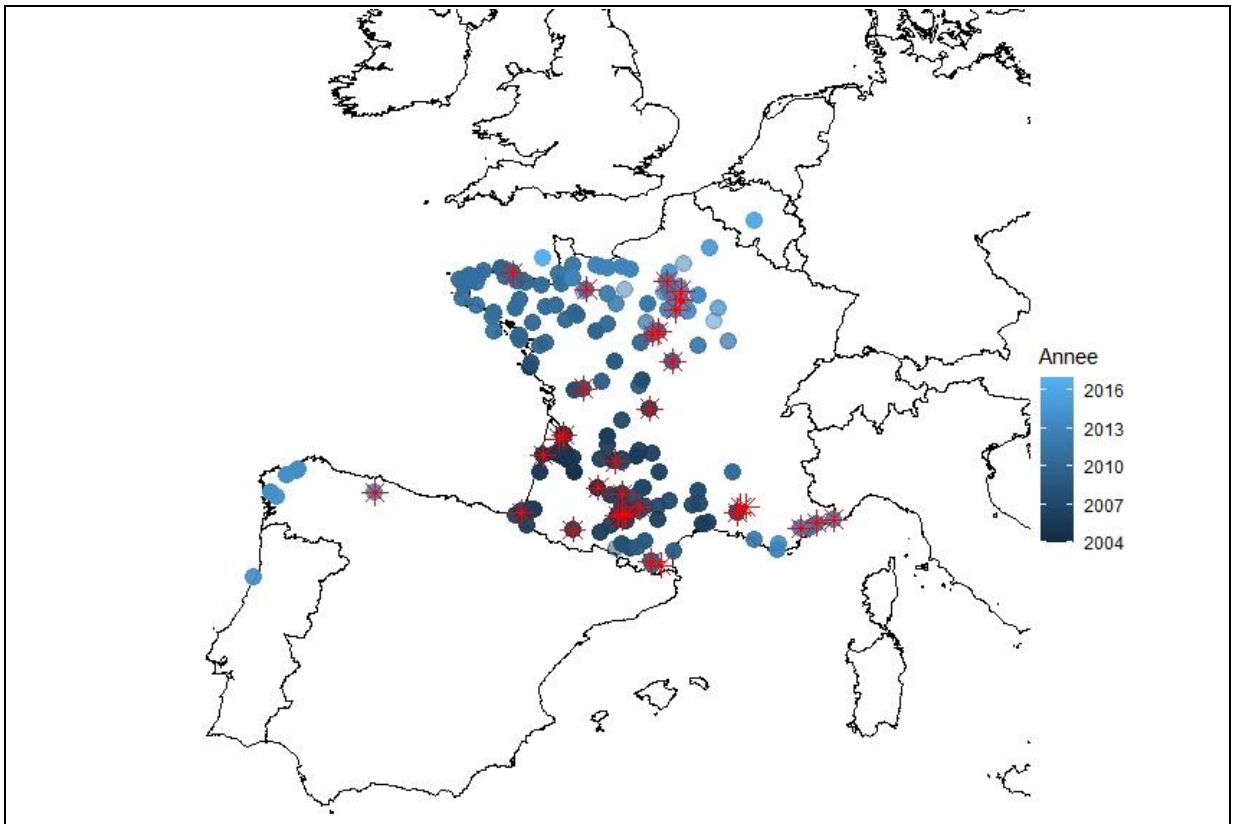


Figure 7
Carte d'échantillonnage des frelons sélectionnés et capturés grâce au projet de science participative EUROFRELON (https://sites.google.com/site/eurofrelon/home). Chaque symbole représente une commune dans laquelle nous avons capturé des frelons asiatiques (point) et européens (étoiles). L'intensité du bleu de chaque point dépend de l'année de colonisation de la commune par le frelon asiatique (déterminée grâce aux cartes établies par le Musée d'Histoire Naturelle de Paris : https://frelonasiatique.mnhn.fr/biologie/#CarteProgression). En 2017, nous avons sélectionné 1305 spécimens de 148 communes dans 5 pays (n_{FRANCE} = 1201, $n_{ESPAGNE}$ = 63, n_{ITALIE}=37, $n_{PORTUGAL}$ = 4). En 2020, nous avons sélectionné 264 spécimens de 23 communes dans 2 pays (n_{FRANCE} = 241, $n_{ESPAGNE}$ = 23). Dans chaque commune, le nombre d'individus sélectionnés variait de 1 à 59.

Morphométrie

Nous avons lavé les frelons en les laissant tremper pendant une heure dans de l'eau distillée et du savon. Nous les avons ensuite séchés dans un four à 75°C pendant 4h. Pour chaque individu nous avons isolé la tête, la patte gauche postérieure, le second sternite de l'abdomen, le thorax et l'aile antérieure gauche (vue en position ventrale) (Figure 8). Nous avons pris des photos de chaque partie du corps avec un microscope de dissection Nikon 127 SMZ 745T (x0,67) couplé à une caméra Toupcam U3CMOS et nous avons réalisé les mesures avec le logiciel Toupview. Pour caractériser la morphologie générale des frelons, nous avons mesuré : la distance maximale inter-oculaire (Figure 8.1), la largeur du mesoscutum (Figure 8.2), la largeur du second sternite de l'abdomen (Figure 8.3) et la longueur du fémur (Figure 8.4) (Cervo et al. 2000; Noll et al. 2004; Felippotti et al. 2010; Kovacs et al. 2010; Pérez-De-Heredia et al. 2017). Nous avons pris ces mesures en cm. Pour caractériser la morphologie des ailes, nous avons calculé leur longueur, largeur et surface. Pour faire ces calculs, nous avons utilisé les coordonnées des jonctions des veines (Figure 8.5) (Baracchi et al. 2011) que nous avons repérées et extraites grâce au logiciel TPS Dig 2.10. Ces mesures ont été prises en pixels. Nous avons également calculé l'*aspect ratio* comme étant $aspect\ ratio = \frac{longueur\ aile^2}{surface\ aile}$. L'aspect ratio est une propriété importante de l'efficacité de vol d'une aile (Kerlinger 1985; Agostini et al. 2015; Bhat et al. 2019).

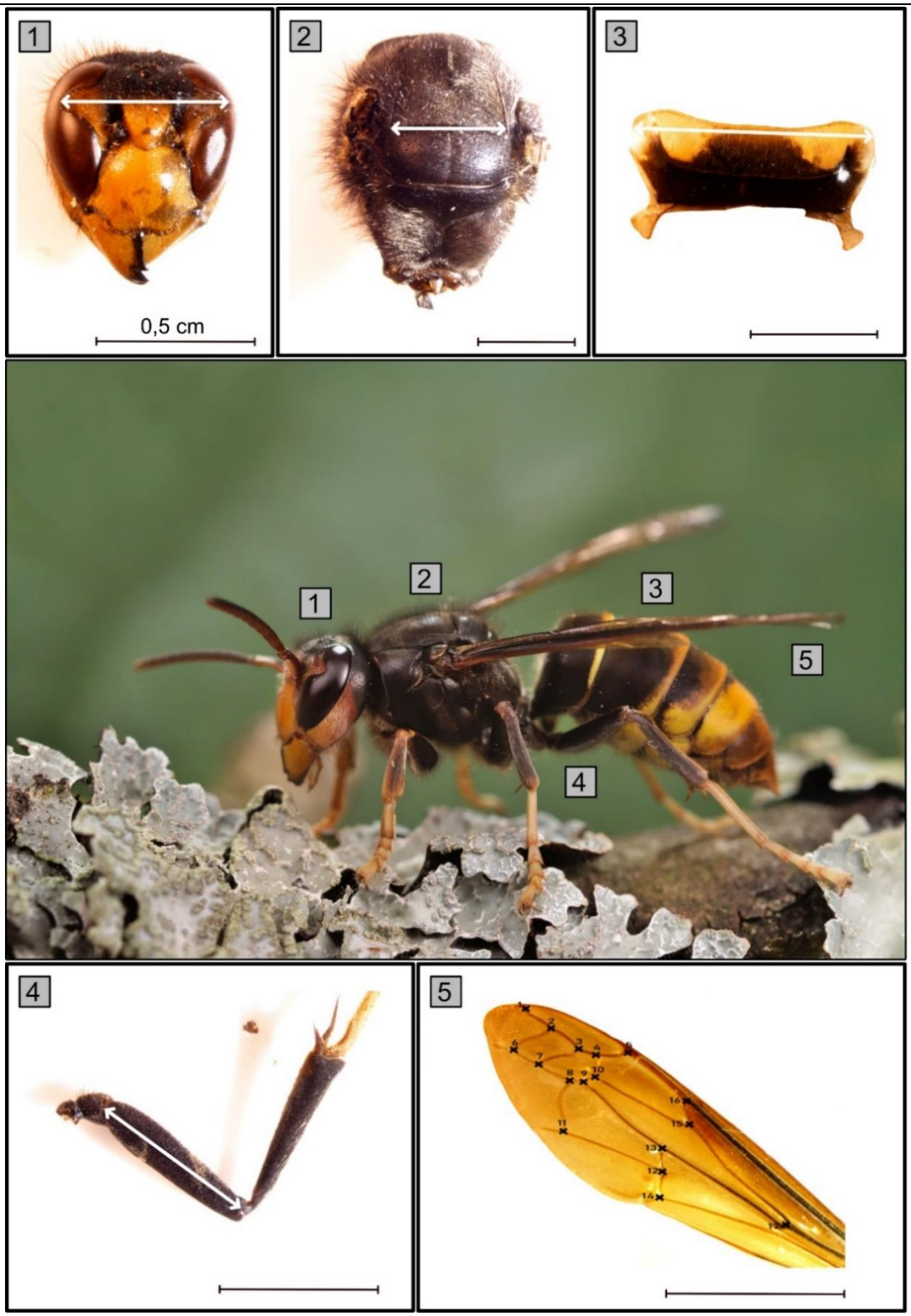


Figure 8
Mesures morphologiques sur les frelons asiatiques (flèches blanches) de (1) la distance maximale inter-oculaire, (2) la largeur du mesoscutum, (3) la largeur du second sternite de l'abdomen, et de (4) la longueur du fémur . (5) 17 jonctions veineuses de l'aile (croix noires ; longueur :1, 17, largeur : 5, 11, surface : 1, 6, 11, 14, 17, 16, 5). Echelle de 0,5 cm (segment noir), la longueur du corps du frelon asiatique mesure environ 3 cm. Les mêmes mesures ont été réalisées sur *Vespa crabro*. Source photo frelon entier : Gilles San Martin (CC BY-SA 2.0)

Données environnementales

Pour chaque individu, nous avons extrait des informations sur la géographie, le climat et la densité urbaine de la commune dans laquelle il a été capturé.

Pour les données géographiques, nous avons classé et comparé les spécimens en fonction de leur proximité avec le front d'invasion en considérant le nombre d'années séparant la collecte de l'échantillon et l'invasion du département par *V. velutina* dans lequel nous avons collecté l'échantillon *(*de 2005 à 2020, 0-15 ans possible). Pour déterminer l'année de colonisation d'un département, nous avons utilisé les cartes d'invasion du frelon asiatique en Europe réalisées par le Musée National d'Histoire Naturelle de France et en libre accès (https://frelonasiatique.mnhn.fr/ biologie/#CarteProgression). Nous avons considéré qu'un département était colonisé quand son statut sur ces cartes était stable et continu avec les autres départements colonisés. De ce fait, un département avec le statut « colonisé » en 2008, « échec de l'invasion » en 2009 et ce, jusqu'à 2011, n'a été considéré comme « colonisé » qu'en 2011 (exemple du département Ile et Villaine, France).

Pour les données climatiques, nous avons considéré les moyennes de trois variables sur les cinq ans qui précédent l'année de capture du spécimen : la température moyenne estivale, la température moyenne hivernale et le cumul annuel moyen des hauteurs de précipitations. Nous avons sélectionné ces variables car la température et les précipitations influencent la distribution des frelons (Villemant et al. 2011a; Bessa et al. 2016). Nous avons sélectionné l'été et l'hiver car nous les avons identifiés comme deux moments critiques, respectivement, pour le développement des fondatrices et leur survie. Les données climatiques de France, d'Espagne, d'Italie et du Portugal proviennent respectivement de l'agence nationale française de la météo (*Météo France*), de l'agence météorologique nationale espagnole (*Agencia Estatal de Meteorologia*), du système national d'élaboration et de diffusion des données climatiques (*Sistema nazionale per l'elaborazione e diffusione di dati climatici*) et d'un site internet en libre accès (*Weather Undergroung*). Nous avons attribué des données climatiques à chaque emplacement de piège en utilisant les données de la station météorologique la plus proche. Dans le cas où

l'ensemble des données n'était pas disponible, nous les avons complétées en utilisant celles de la deuxième station la plus proche.

Pour la densité urbaine, nous avons utilisé le nombre d'habitants par km² de l'unité urbaine à laquelle appartient la commune de collecte de l'échantillon. L'unité urbaine est un groupe d'une ou plusieurs villes totalisant une population d'au moins 2000 habitants et caractérisé par une continuité des aires construites dans laquelle la distance entre deux bâtiments voisins n'excède pas 200 mètres. Quand les villes n'appartenaient à aucune unité urbaine, nous avons utilisé la densité urbaine de la commune. Nous avons extrait ces données depuis l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) français (https://www.insee.fr/).

Succès reproducteur

Pour distinguer le processus de sélection morphologique sous-jacent aux potentielles modifications morphologiques des frelons, nous avons utilisé des données collectées ultérieurement à celles de notre étude (Poidatz 2017)afin de mesurer la corrélation de ces traits avec des indices de fertilité des fondatrices, relatifs à leur succès reproducteur. Nous avons utilisé ces données afin d'apporter des éléments de réponses concernant les potentiels avantages reproducteurs que pourraient apporter des morphes dispersants. Les reines de frelon conservent les spermatozoïdes des mâles avec lesquels elles se sont accouplées pendant l'automne dans leur spermathèque et utilisent ce stock pour féconder les œufs (Matsuura 1991). Les œufs sont produits grâce aux stocks énergétiques accumulés sous forme de graisses dans les corps gras de leur abdomen (Kovacs and Goodisman 2012). De ce fait, le succès reproducteur d'une fondatrice dépend, en partie, de sa fertilité, qui permet d'assurer le développement maximal de la colonie et la production de sa descendance.

En 2016, grâce à l'aide de volontaires, Poidatz et al. (2017) ont capturé des frelons asiatiques en Aquitaine (n=251) et en Bretagne (n=36). Les frelons collectés en Aquitaine ont été disséqués immédiatement après capture tandis que les frelons de Bretagne ont été conservés jusqu'à 15 jours dans

un réfrigérateur (4°C). La dissection de l'abdomen a permis d'obtenir des indices de fertilité tels que le nombre total de spermatozoïdes présents dans la spermathèque ($n_{AQUITAINE}$ = 157, $n_{RETAGNE}$ = 36), la superficie de la spermathèque ($n_{AQUITAINE}$ = 155, $n_{RETAGNE}$ = 36), ainsi que le poids des corps gras ($n_{AQUITAINE}$ = 154, $n_{RETAGNE}$ = 32), (Poidatz et al. 2018 pour méthodes). Nous avons extrait de ce jeu de données des traits de dispersion (*aspect ratio*) et de reproduction (nombre de spermatozoïdes, surface de la spermathèque, poids des corps gras). Nous avons calculé l'AR en utilisant les données de longueur et de surface des ailes de ces frelons (qui avait été mesurées avec le logiciel Image J ©). Nous avons comparé la corrélation entre ces différents traits dans la zone d'introduction (Aquitaine) et dans une zone de front d'invasion (Bretagne).

Analyse des données

Toutes les analyses ont été effectuées sous R 4.2.1 (R core Team 2022) en utilisant le package *nlme* (Pinheiro and Bates 2000; Pinheiro et al. 2023).

Nous avons restreint l'échantillonnage des frelons du mois de mars à mai afin de nous assurer que nous collections en grande majorité des fondatrices. Cependant, à la fin du mois de mai, les deux castes (fondatrices et ouvrières précoces) peuvent être présentes dans les colonies (Rome et al. 2015). Dans notre jeu de données, nous avons identifié si d'éventuelles variations de taille apparaissaient puisqu'elles peuvent être caractéristiques d'un dimorphisme entre les fondatrices et les ouvrières au sein du genre *Vespa* (Rome et al. 2015). Nous avons utilisé les mesures de largeur de la tête, du thorax, de l'abdomen et de la longueur du fémur pour exclure de notre jeu de données les ouvrières en dehors de la distribution de ces quatre variables (Annexe 2, Figure 41). En utilisant ces critères, nous avons gardé 1530 fondatrices de frelons asiatiques (sur les 1558 individus mesurés) et 212 fondatrices de frelons européens (sur 234 individus mesurés).

A partir de notre jeu de données, nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet de la zone géographique, du climat et de l'urbanisation sur la morphologie des frelons. Pour chaque variable morphologique, nous avons réalisé un modèle mixte linéaire (LMM), avec une structure aléatoire dans laquelle la commune était imbriquée dans l'unité urbaine, et quatre variables fixes : le nombre d'années séparant la capture et l'établissement local de la population de frelon asiatique (*TimeSinceCol*), la moyenne des températures estivales (*Tsummer*), la moyenne des températures hivernales (*Thiver*), la moyenne des précipitations annuelles (*Precipitation*) sur les cinq années précédant la capture des individus, et la densité humaine des unités urbaines (*UrbanDensity*). En plus de la validation du modèle, nous avons vérifié qu'aucune structure spatiale ne subsistait dans les résidus.

Pour déterminer si les frelons capturés sur différents fronts d'invasion (Nord, Italien et Ibérique) présentaient des phénotypes différents, nous avons réalisé des modèles additionnels dans lesquels nous avons remplacé la variable quantitative *TimeSinceCol* par une variable *PopCategory,* prenant quatre valeurs possibles : *Core, NothernFront, ItialianFront* and *IberianFront.* Nous avons considéré qu'un individu appartenait au *Core* ou au *Front* s'il avait été capturé dans une zone où la population a été établie, respectivement, il y a plus de 10 ans ou moins de 6 ans. Nous avons choisi ces valeurs limites pour nous assurer que chaque catégorie (*Core* ou *Front*) englobe le même nombre d'années (5 ans, puisque la valeur maximale de *TimeSinceCol* était de 15 ans).

Finalement, nous avons voulu déterminer s'il y avait un lien entre la morphologie des frelons et leur succès reproducteur. Pour évaluer le succès reproducteur des fondatrices, nous avons utilisé les indices de fertilité suivants : le nombre total de spermatozoïdes (*TotSPZ)*, la surface de la spermathèque (*SurfS*), et le poids des corps gras (*PoidsCG*). Pour chaque indice de fertilité, nous avons réalisé plusieurs modèles linéaires (LM) (distinctement pour l'Aquitaine et pour la Bretagne) avec trois facteurs fixes : la largeur de la tête, la largeur du thorax, et l'*aspect ratio.*

RÉSULTATS

Dans un premier temps, nous avons comparé la morphologie des frelons asiatiques en fonction de leur zone géographique de capture. Nos résultats indiquent que les frelons ont un plus grand *aspect ratio* sur le front de l'invasion (pas de distinction entre les différents fronts). En effet, les fondatrices échantillonnées sur le front d'invasion ont des ailes avec un plus grand *aspect ratio* (LMM, t = -3,87, p < 0,001) et des ailes plus longues (LMM, t = -2,59, p = 0,002 ; + 1,48% and + 2,16% respectivement entre les deux extrêmes de *TimeSinceCol)* que les fondatrices échantillonnées dans la zone d'introduction. Les autres variables morphologiques ne varient pas avec le nombre d'années qui séparent la capture et l'établissement local de la population (*TimeSinceCol)* (Annexe 2, Tableau 9). Par conséquent seule la morphologie des ailes change en fonction de la dynamique d'invasion des frelons.

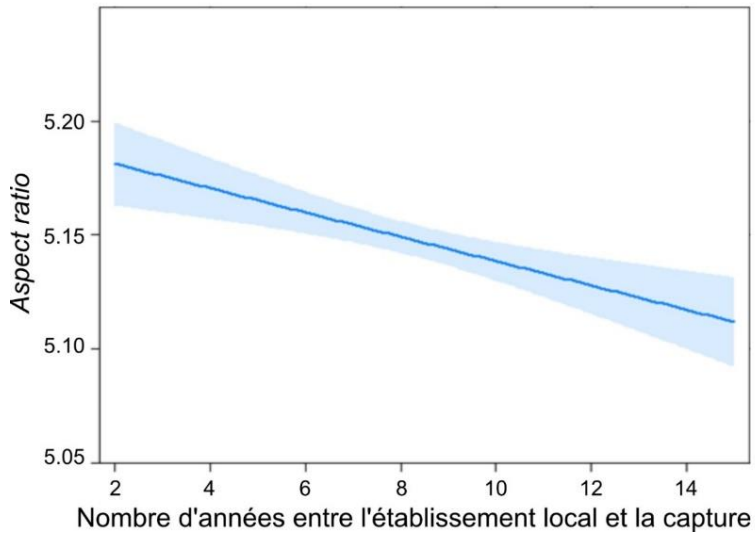


Figure 9
Aspect ratio moyen (ligne bleu foncé) et intervalle de confiance à 95% (surface bleu clair) des ailes de frelon asiatique en fonction du nombre d'années entre l'établissement local et la capture. Les données sont extraites du modèle statistique (LMM), package effects (Fox and Weisberg 2018).

Nous avons ensuite comparé les frelons issus des trois fronts d'invasion : Nord, Italie, Ibérique. Les *aspect ratio* des ailes de fondatrices diffèrent entre ces fronts. Sur le front italien, les fondatrices ont un *aspect ratio* plus élevé que sur le lieu de l'introduction (LMM, t =2,19, p = 0,032). Sur le front Nord, cette tendance est également observée (LMM, t =1,70, p = 0,094). Sur le front Ibérique, cependant, l'*aspect ratio* des fondatrices ne diffère pas entre le front d'invasion et le lieu d'introduction (LMM, t =-1,04, p=0,299), ce qui pourrait être lié à un problème de puissance statistique. De plus sur le front Nord, les individus ont des ailes plus longues (LMM, t=2,18, p=0,033), un abdomen plus petit (LMM, t =-2,06, p =0,044) et un thorax plus petit (t =-1,72, p =0,091). Ces variables ne diffèrent pas pour les fronts italiens et ibériques.

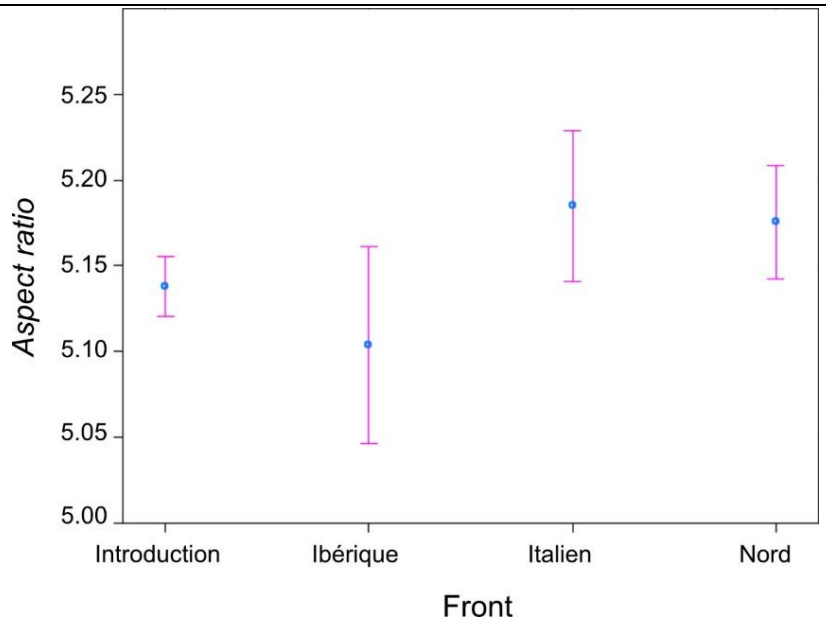


Figure 10
Effet prédit de *l'aspect ratio* moyen (point bleu) et l'intervalle de confiance à 95% des ailes des fondatrices de frelon asiatique en fonction de leur situation géographique sur le lieu d'introduction et le front. Package effects (Fox and Weisberg 2018).

Nous avons ensuite testé si cette corrélation entre le temps depuis l'établissement local de la population et la morphologie des ailes observées sur certains fronts d'invasion pouvait être expliquée par des paramètres environnementaux. Globalement, notre analyse indique que l'*aspect ratio* augmente avec la température moyenne estivale (+1,71% entre le minimum et le maximum des valeurs *Tsummer* ; LMM, t = 4,40, p <0,001). La largeur et la longueur des ailes diminuent quand la température moyenne hivernale augmente (-1,73% entre le minimum et le maximum des valeurs de *Twinter,* LMM, t = -2,49, p = 0,013 pour la largeur des ailes et -1,63% entre le minimum et le maximum des valeurs de *Twinter,* LMM, t = -3,31, p = 0,011 pour la longueur des ailes). La taille du thorax diminue quand la température hivernale moyenne augmente (-2,10%, LMM, t=-2,411, p=0,016). Les autres variables morphologiques ne sont pas impactées par les variables environnementales (Annexe 2, Tableau 9 et 10).

Pour confirmer que ces variations étaient bien dues à l'invasion récente des frelons asiatiques, nous avons ensuite réalisé les mêmes analyses sur le frelon européen (*V. crabro*). Aucune des mesures morphologiques réalisées n'est impactée par le nombre d'années séparant la capture et l'établissement local de la population de frelons européens (Annexe 2, Tableau 9). La largeur de la tête et de l'abdomen augmente avec la température moyenne hivernale (tête: LMM, t = 2,10, p = 0,037 ; abdomen: LMM, t = 3,70, p < 0,001). La largeur de l'abdomen diminue avec la température moyenne estivale (LMM, t = -3,15, p < 0,001). La moyenne annuelle des précipitations et la densité urbaine n'ont pas d'effet sur la morphologie des frelons (Annexe 2, Tableau 9). L'*aspect ratio* des ailes et la longueur du fémur ne sont pas impactés par les variables climatiques que nous avons considérées. Cependant, la longueur des ailes augmente quand la température hivernale moyenne augmente (t=2,11, p=0,036).

Nous avons enfin testé l'impact des différenciations morphologiques observées au niveau des ailes chez les frelons asiatiques sur leur succès reproducteur. L'*aspect ratio* est corrélé positivement avec les traits reproducteurs au cœur de la distribution, mais pas proche du front d'invasion. Pour les

frelons collectés en Aquitaine (lieu d'introduction, colonisé depuis 11 ans), le nombre de spermatozoïdes (*TotSPZ)* et le poids des corps gras (*PoidsCG*) augmentent significativement avec l'aspect ratio (spermatozoïdes : LM, *largeur tête :* df= 1, F =0,015, p =0,904, *largeur thorax :* df=1, F =0,607, p- =0,437, *aspect ratio :* df=1,F =2,805, p =0,006 ; corps gras : LM, *largeur tête :* df=1, F =2,013, p =0,158, *largeur thorax :* df=1, F =0,907, p =0,343, *aspect ratio :* LM, df=1, F =9,312, p = 0,003) (Figure 11). La surface de la spermathèque (*SurfS*) a tendance à augmenter avec la taille de la tête (spermathèque : LM, *largeur tête :* df=1, F=3,531, p=0,062, *largeur thorax :* df=1, F=1,073, df=1, p=0,302, *aspect ratio :* LM, F=1,211, p= 0,273). Pour les frelons de Bretagne (lieu plus proche du front, colonisé depuis 5 ans au moment de la capture), la surface de la spermathèque (*SurfS*) a tendance à diminuer avec l'augmentation de l'AR (spermatozoïdes : LM, *largeur tête :* F=0,793, p=0,381, *largeur thorax :* F=0,274, p=0,605, *aspect ratio :* LM, F=2,080, p=0,780 ; corps gras : LM*, largeur tête :* F=1,674, p=0,208, *largeur thorax :* F=0,349, p=0,560, *aspect ratio :* F=0,696, p= 0,412 ; spermathèque : LM*, largeur tête :* F=0,167, p=0,686, *largeur thorax :* F=2,011, p=0,168, *aspect ratio :* F=3,434, p= 0,075) (Figure 11). Par conséquent, l'augmentation de l'aspect ratio des frelons asiatiques observés sur les fronts d'invasion ne semble pas leur proférer d'avantages en termes de succès reproducteur.

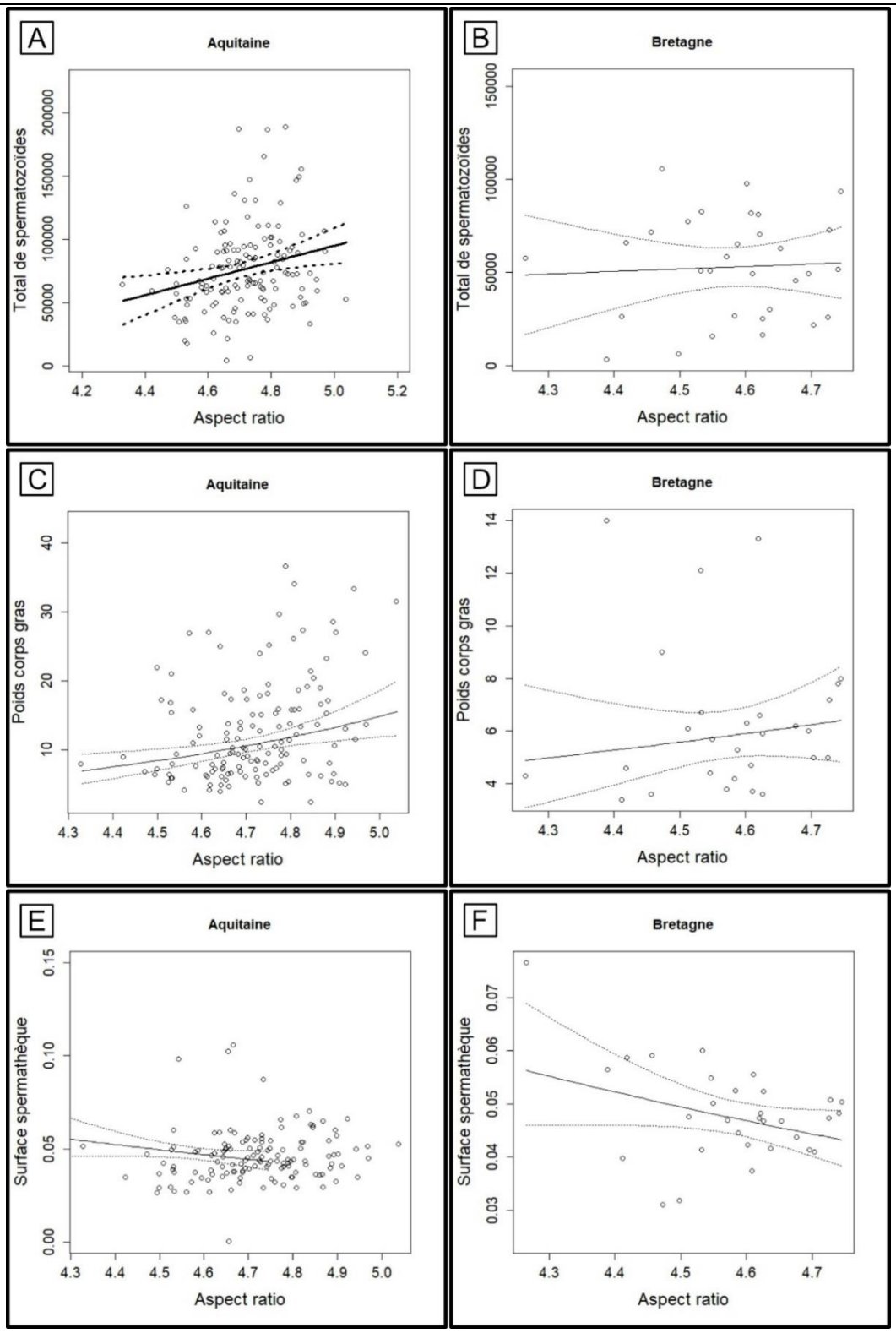


Figure 11

Lien entre traits reproductifs et dispersants des frelons asiatiques collectés en Aquitaine (A, C, E) et en Bretagne (B, D, F). A, B) Total du nombre de spermatozoïdes dans la spermathèque et C, D) poids des corps gras (mg) en fonction de l'*aspect ratio* de frelons capturés en Aquitaine. E, F) Surface de la spermathèque (mm²) en fonction de l'*aspect ratio* de frelons capturés en Bretagne. Intervalle de confiance à 95% (traits discontinus).

DISCUSSION

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes favorisant la dispersion rapide et toujours en cours du frelon asiatique en Europe. Pour cela, nous avons étudié les déterminants morphologiques mis en cause et testé l'hypothèse du tri spatial pour expliquer le processus sélectif sous-jacent, une théorie à notre connaissance recensée pour peu d'espèces (criquets, Simmons and Thomas 2004 ; pins, Cwynar and MacDonald ; papillons, Hughes et al. 2007 ; fourmis, Léotard et al. 2009) et détaillée uniquement dans le cas des crapauds buffles (*Rhinella marina*) en Australie. Sur la base d'une large campagne de collecte participative, nos résultats indiquent que les frelons asiatiques sur les fronts d'invasion Italien et Nord ont des ailes avec de plus grands *aspect ratio* comparés à ceux proches du lieu d'introduction. La variabilité de l'*aspect ratio* est liée à la situation géographique des fondatrices mais également au climat. Il augmente quand les températures estivales augmentent et quand les températures hivernales diminuent. Sur le lieu d'introduction, l'augmentation de l'*aspect ratio* est corrélé à des avantages reproductifs, que l'on ne semble pas retrouver sur le front Nord. Sur les mêmes lieux géographiques, nous ne retrouvons pas ces mêmes variations morphologiques entre les frelons européens.

Les frelons asiatiques collectés sur les fronts d'invasion ont un *aspect ratio* plus grand et des ailes plus longues que les frelons collectés sur lieu d'introduction. L'*aspect ratio* est le ratio entre la longueur de l'aile au carré et sa surface. Chez les insectes, lorsque l'*aspect ratio* diminue, il entraine une augmentation de la traînée (force qui s'oppose au corps), ce qui diminue le taux de « glissement » (*glide ratio*) dans l'air. Les insectes porteurs d'un ratio de glissement plus faible sont dans l'incapacité de planner (Bhat et al. 2019). De plus, la diminution de l'envergure des ailes augmente les battements d'ailes nécessaires pendant le vol de manière exponentielle (Bhat et al. 2019) et, de ce fait, l'énergie dépensée. On peut donc supposer qu'à énergie disponible équivalente, les frelons avec des *aspect ratio* plus grands seraient plus aptes à l'économiser. De plus, les papillons (*Lymantria dispar*) qui ont des ailes plus longues volent sur des distances plus longues (Jahant-Miller et al. 2022). Nos résultats suggèrent donc que les individus sur le front d'invasion ont de meilleures capacités de dispersion grâce à un *aspect ratio* plus grand et des ailes plus longues.

Ces traits favorisant la dispersion se retrouvent dans les populations de frelons appartenant aux fronts Nord (significatif) et Italien (tendance) mais ne se retrouvent pas sur le front Ibérique. Lors des campagnes de collecte, nous avons obtenu relativement peu de frelons des fronts ibérique (n=67) et Italien (n=37), et provenant de peu de communes (respectivement, n=6 et n=1). Le modèle statistique que nous avons utilisé pour tester les différences d'*aspect ratio* entre les fronts (Figure 10) nous montre que la confiance dans l'estimation de la moyenne des *aspect ratio* du modèle est peu importante pour le front Ibérique par rapport aux deux autres fronts. Cette faible confiance dans l'estimation de la moyenne peut s'expliquer soit par le fait qu'il y ait très peu de variabilité dans nos données, soit par le fait que nos échantillons proviennent d'un trop faible nombre de communes. Par conséquent l'absence de différenciation morphologique sur le front ibérique est peut-être due à un manque de puissance statistique.

Le temps séparant la capture et l'établissement local de la population explique en partie la morphologie des ailes mais il existe également une influence climatique. L'augmentation de la température moyenne estivale favorise la présence d'insectes avec de grands *aspect ratio*. Par exemple, quand il fait chaud, les guêpes thermorégulent de manière active leur nid pour abaisser leur température (Perez and Aron 2020; Stabentheiner et al. 2022). De plus, lorsque les températures deviennent trop élevées et dangereuses pour les fourrageuses, l'activité de fourragement diminue (Kasper et al. 2008, observations personnelles). On peut supposer que lorsque la température estivale augmente, le temps que les ouvrières allouent au fourragement pour nourrir les futures fondatrices diminue car elles arrêtent leurs activités de fourragement et sont occupées à thermoréguler le nid. Les fondatrices seraient alors moins bien nourries, ce qui exercerait une pression de sélection pour des ailes avec un *aspect ratio* plus élevé. En effet, à l'automne, lors du déclin de la colonie, les fondatrices ayant déjà des réserves énergétiques diminuées à cause de leur alimentation estivale, pourraient avoir un vol énergétiquement moins coûteux (pour se reproduire, trouver abris). Les réserves de gras étant nécessaires pour l'hibernation (Martin 1993; Woodard et al. 2019), les fondatrices avec un aspect ratio élevé pourraient être avantagées dans les zones où la température estivale est élevée.

Nos résultats indiquent également que lorsque la température hivernale diminue, l'*aspect ratio* des ailes des fondatrices augmente. Pendant l'hibernation, les fondatrices consomment leurs réserves en énergie (Shi et al. 2023) et on peut supposer que lorsque les hivers sont plus rudes, les fondatrices en consomment une plus grande partie. Leur stock d'énergie étant diminué, cela pourrait exercer une plus grande pression sur les fondatrices lorsqu'elles sortent de l'hibernation pour initier la fondation de leur colonie. Un *aspect ratio* élevé pourrait avantager les reines au printemps puisqu'elles pourraient dépenser moins d'énergie en volant, énergie nécessaire pour s'alimenter et fonder la colonie (construction du nid, ponte et soin des œufs). En effet, l'établissement du nid au printemps (Hunt 2007) est une phase très critique chez les frelons puisque seulement 31% y parviennent (Archer 2010).

Dans une zone colonisée depuis 11 ans (Aquitaine), l'*aspect ratio* des fondatrices de frelons asiatiques est positivement corrélé au nombre de spermatozoïdes dans la spermathèque et au poids des corps gras. Pour ces fondatrices, porter des ailes plus longues pourrait leur permettre de se déplacer plus en dépensant moins d'énergie pour s'accoupler. Par exemple, cela pourrait leur permettre de s'accoupler avec plus de mâles ou avec des mâles plus fertiles, ce qui expliquerait l'augmentation du nombre de spermatozoïdes. Puisque le vol serait énergiquement moins couteux, que ce soit pour se reproduire ou se nourrir, les réserves de graisse dans les corps gras seraient moins sollicitées. Cependant, dans une zone colonisée depuis seulement 5 ans (Bretagne), l'*aspect ratio* a tendance à être corrélé négativement avec la surface de la spermathèque. Les données dont nous disposons suggèrent que l'*aspect ratio* ne confère des avantages reproductifs que dans la zone d'introduction, ce qui impliquerait avoir un coût à la dispersion, indépendamment de la morphologie. Nous n'avons pas suffisamment de données bretonnes (n=36) pour conclure si cet effet est lié à des effets climatiques ou à l'âge de la population.

Déterminer les processus qui sous-tendent la sélection de ces phénotypes hautement dispersants sur les fronts d'invasion est difficile à établir. Notre étude montre que les frelons asiatiques sur les fronts d'invasion sont porteurs de caractéristiques alaires (*aspect ratio*) qui leur permettraient de voler

sur de plus grandes distances en dépensant moins d'énergie. Cela suggère que cette sélection a eu lieu spatialement puisque le climat n'explique pas à lui seul ces différences morphologiques. Bien que sur le lieu d'introduction, les individus porteurs d'ailes avec un plus grand *aspect ratio* ont un plus grand succès reproducteur, ces avantages ne sont pas retrouvés sur les frelons d'une zone géographique ayant été envahie plus récemment (Bretagne). Ces résultats semblent écarter l'action d'un processus de sélection naturelle qui favoriserait la présence de traits augmentant le succès reproducteur des individus. Cependant, les données de la thèse de Juliette Poidatz (Poidatz 2017) montrent des résultats opposés sur deux zones récemment envahies. Des frelons capturés en Bretagne ont moins de spermatozoïdes et moins de corps gras que les frelons d'Aquitaine (Poidatz 2017, Figure 33). Les frelons capturés en Italie en ont plus, ce qui pourrait indiquer une sélection naturelle positive. Malheureusement, les données alaires Italiennes n'étant pas disponibles, nous n'avons pu étudier la relation entre l'*aspect ratio* et les indices de fertilité d'Aquitaine et de Bretagne. Pour confirmer nos résultats, il serait intéressant de pouvoir échantillonner et mesurer les traits dispersants et reproductifs des individus d'un front encore plus récent afin d'avoir un continuum de données géographiques.

Pour conclure, la rapidité d'expansion du frelon asiatique en Europe semble être liée à une modification de la morphologie des ailes, qui sont plus longues et ont un *aspect ratio* plus grand sur les fronts d'invasion. Ce type d'ailes leur permettent de se déplacer sur de plus grandes distances en consommant moins d'énergie (Bhat et al. 2019). Même si nos résultats suggèrent un tri spatial, nous ne pouvons, avec les données disponibles, distinguer définitivement le processus qui sous-tend ces variations morphologiques. Pour confirmer la présence d'un tri spatial, il serait nécessaire d'enrichir notre jeu de données sur le succès reproducteur en fonction des morphes dispersants. Pour cela, nous devrions ajouter un large échantillonnage de fondatrices sur les fronts d'invasions les plus récents et tester la relation entre des traits dispersants et reproducteurs. De plus, nous pourrions mesurer expérimentalement la quantité et la qualité des spermatozoïdes présents dans la spermathèque des femelles en fonction du nombre de partenaires avec lesquels elles se seraient accouplées. Ces expériences nous

renseigneraient plus précisément sur le lien entre le nombre de spermatozoïdes, la taille de la spermathèque et le succès reproducteur d'une fondatrice. En effet, le remplissage de spermathèque par les spermatozoïdes des mâles dépend de leurs productions spermatiques. Une spermathèque remplie peut résulter d'un accouplement avec peu de mâles qui produisent un grand nombre de spermatozoïdes ou de nombreux mâles qui produisent peu de spermatozoïdes.

Il serait également intéressant de comparer la variabilité de phénotypes que nous observons en Europe avec la variabilité de l'espèce dans son aire native. Si les différences que nous observons en Europe ne sont pas retrouvées en Asie, alors cela soutiendrait l'hypothèse que ces différences sont liées au processus d'invasion. A notre connaissance, ces données ne sont pas disponibles.

Nos résultats prédisent une accélération de la vitesse de dispersion des frelons asiatiques. Cette augmentation reste à quantifier mais pourra être ajoutée aux modèles mathématiques existants de dispersion de l'espèce (Villemant et al. 2011a; Bessa et al. 2016). Leur précision permettra de mieux anticiper l'arrivée des frelons asiatiques sur de nouveaux territoires. Cette connaissance permet aussi aux pays concernés, en amont de l'arrivée du frelon, de mettre en place des méthodes préventives telles qu'un réseau de surveillance et une destruction immédiate des premiers nids identifiés sur la zone. De plus, cela permet aussi d'anticiper la mise en place de programme de sensibilisation à l'attention des différents acteurs touchés par la présence du frelon afin que les méthodes de lutte qu'ils utilisent soient les plus efficaces (luttes adaptées par saison) et qu'elles impactent au minimum les autres espèces d'insectes.

CHAPITRE 2 : UTILISATION D'INFORMATIONS VISUELLES ET SOCIALES DANS LE CHOIX DES SITES DE FOURRAGEMENT

RÉSUMÉ

Lorsque les espèces invasives se dispersent dans l'environnement, elles font face à des milieux et des ressources inconnues. Pour les identifier et les exploiter, elles peuvent utiliser des stratégies individuelles ou collectives. Les frelons asiatiques ont rapidement envahi l'Europe, ce qui les a confrontés à des environnements très différents. Afin de comprendre les mécanismes sous-tendant ce haut potentiel invasif, nous avons voulu avoir une compréhension détaillée des stratégies qu'ils utilisent pour exploiter les ressources. Le nectar est un item alimentaire indispensable pour la survie d'une colonie de frelons, aussi bien pour les adultes que pour le couvain. Nous avons d'abord fait l'hypothèse que les frelons, tels que de nombreux Hyménoptères, étaient capables d'apprendre et d'utiliser des informations visuelles pour identifier des ressources florales profitables. De plus, nous avons également supposé que c'est leur grande flexibilité cognitive qui leur a permis et leur permet toujours d'être hautement invasif. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé la flexibilité cognitive de l'espèce invasive *V. velutina* et d'une autre espèce de frelon, présente en Europe depuis plusieurs centaines d'années, *V. crabro*. Nous avons démontré que les deux espèces de frelons avaient la même flexibilité cognitive. Par conséquent, ce n'est pas ce facteur qui a joué sur leur succès invasif. Nous avons ensuite fait l'hypothèse qu'ils étaient capables d'utiliser d'autres types d'informations pour accéder à une ressource profitable, des informations sociales. Pour le tester, nous avons comparé la quantité de captures de frelons dans deux pièges identiques et proches l'un de l'autre. La répartition des frelons entre ces deux pièges nous ont permis de démontrer que les frelons des deux espèces avaient une interattraction de leurs individus. En effet, dans la majorité des cas, ces derniers s'accumulaient dans un même piège plutôt que de se répartir équitablement entre les deux. Ces résultats démontrent non seulement la capacité des frelons à recruter d'autres individus sur un site de nourriture, mais également donne des pistes non négligeables de contrôle des populations.

CHAPITRE 2 : UTILISATION D'INFORMATIONS VISUELLES ET SOCIALES DANS LE CHOIX DES SITES DE FOURRAGEMENT

INTRODUCTION

Dans le chapitre 1, j'ai démontré que la rapidité d'invasion du frelon asiatique en Europe pouvait être liée, en partie, à des traits morphologiques (plus grand *aspect ratio* des ailes) favorisant la dispersion sur de plus grandes distances. Pendant la dispersion, les frelons font face à de nouveaux environnements auxquels ils doivent s'adapter pour nicher, se nourrir et se reproduire. Le niveau de flexibilité comportementale (Wright et al. 2010; Chapple et al. 2012) et d'efficacité dans l'exploitation des ressources, notamment alimentaires (Valdovinos et al. 2018), conditionne en partie le succès de l'invasion. En effet, les espèces envahissantes doivent être capables de détecter les nouvelles ressources, de développer des compétences pour les exploiter et de mémoriser les informations adéquates qui leur permettront de les identifier à nouveau et de les traiter dans le futur. La difficulté varie en fonction du degré de correspondance adaptative entre l'animal et son nouvel environnement (Duncan et al. 2003; Sol et al. 2007). Plus le nouvel environnement est différent de celui d'origine, plus le niveau d'adaptabilité et d'efficacité des animaux doit être important.

Les frelons asiatiques sont des insectes sociaux qui vivent en colonie dans lesquelles les ouvrières sont chargées de fourrager et d'alimenter l'ensemble des membres de la colonie à partir d'un nid fixe (*central place foragers*). Ces ouvrières doivent faire des aller-retours entre les sites d'intérêt sur lesquels il y a des ressources exploitables et leur nid. Pour identifier et exploiter ces ressources, les insectes peuvent utiliser plusieurs stratégies, parfois simultanément : des stratégies individuelles (exploitation d'indices appris) et collectives (exploitation d'indices sociaux). Les études sur les stratégies de fourragement des frelons asiatiques sont principalement focalisées sur leur comportement de

chasse (Tan et al. 2007; Monceau et al. 2014, 2017) bien que tous les membres d'une colonie ont également besoin de s'alimenter en sucres sous forme de miel, miellat et nectar (Richter 2000). La manière dont les frelons asiatiques exploitent ces ressources, leur flexibilité et leur efficacité est encore méconnue (Ueno 2015) alors que cela pourrait contribuer à la compréhension du succès d'invasion et d'une meilleure appréhension du comportement de l'espèce dans un contexte de lutte biologique.

Dans ce chapitre, nous avons étudié la manière avec laquelle les frelons asiatiques utilisent les informations de leur environnement pour identifier et exploiter une ressource sucrée de type nectar (liquide sucré). Les hyménoptères sociaux tels que les abeilles et les guêpes utilisent largement les informations visuelles (Avarguès-Weber et al. 2011) et/ou des informations sociales (Leadbeater and Chittka 2009) de manière directe (par apprentissage) ou indirecte (par simple attraction) pour accéder à des ressources profitables dans leur environnement. Nous avons fait l'hypothèse que ces comportements étaient également présents chez les frelons asiatiques, un autre hyménoptère social qui exploite des ressources florales. Plus particulièrement nous avons testé l'utilisation d'informations (1) visuelles et (2) sociale dans les choix des ressources par les ouvrières butineuses de frelon asiatique.

SOUS-CHAPITRE 2.1 : APPRENTISSAGE VISUEL ET FLEXIBILITÉ COGNITIVE POUR IDENTIFIER DES RESSOURCES

CONTRIBUTIONS

Mathilde Lacombrade[1,2,3,4], Monica Doblas-Bajo[5], Naïs Rocher[2], Zoé Tourrain[2], Emmanuel Navarro[6], Christian Lubat[6], Fanny Vogelweith[3], Denis Thiéry[2], Mathieu Lihoreau[1]

[1] Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI); Université Paul Sabatier - Toulouse III, France

[2] UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRAe, F-33883 Villenave d'Ornon, France

[3] M2i Biocontrol, 370 route de Cauzenil, 46140 Parnac, France

[4] Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Université de Toulouse, CNRS, INPT, Toulouse, France

[5]Department of Biodiversity and Environmental Management, Universidad de Leon, Campus de Ponferrada, 24401, Ponferrada, Espagne

[6] BeeGuard SAS, Labège, France

MLa et MLi ont mis en place le design expérimental de cette étude. MLa, NR, MD-B, ZT ont collecté les données. MLa ont analysé les données.

Les résultats de ce sous-chapitre ont fait l'objet d'une publication (Annexe 3) :
Lacombrade et al. , Flexible visual learning in nectar-foraging hornets. *Behav Ecol Sociobiol* **77**, 76 (2023). https://doi.org/10.1007/s00265-023-03349-z
Ici, et article a été traduit et modifié.

J'ai présenté ces résultats sous forme de deux communications orales à un congrès européen et à un forum de l'Université de Toulouse :

- **Lacombrade et al. 2022**, Cognitive flexibility in Asian hornet, *8th European Student Conference on Behaviour & Cognition,* 3-7 septembre 2022 à Rovereto, Italie
- **Lacombrade et al. 2022,** Les capacités cognitives du frelon asiatique : vers de nouveaux moyens de lutte, *Invitée au forum des sciences cognitives de l'Université Paul Sabatier,* 25 mai 2022, Toulouse, France

INTRODUCTION

Les animaux qui se nourrissent de nectar, comme les abeilles, les papillons, les oiseaux et les chauves-souris ont développé un répertoire cognitif riche pour reconnaître les fleurs (Healy and Hurly 2003; von Helversen and von Helversen 2003; Srinivasan 2010; Cepero et al. 2015). Les abeilles, par exemple, mémorisent les formes, les couleurs et les motifs pour identifier les espèces qui leur procurent la plus grande récompense (Wehner 1967; Giurfa et al. 1999; Collett and Collett 2002; Dyer and Chittka 2004; Srinivasan 2006; Chittka and Raine 2006). Certaines de ces informations peuvent être gardées en mémoire pendant des jours ou des semaines (Chittka and Thomson 2001), ce qui permet aux insectes de se spécialiser sur un type de fleurs (et de ce fait, avoir une constance florale, Chittka et al. 1999). Les butineuses peuvent discriminer les fleurs par apprentissage associatif entre un stimulus et la présence ou l'absence d'une récompense sucrée (apprentissage différentiel, Giurfa 2007). Elles sont également capables de flexibilité cognitive. Cette capacité leur permet d'actualiser les associations apprises et d'en apprendre de nouvelles (apprentissage d'inversion de consigne) dans le cas où une nouvelle ressource apparaîtrait ou qu'une ressource déjà existante deviendrait indisponible (reversal learning, Raine and Chittka 2012). Par conséquent, nous nous attendons à ce que la flexibilité de l'apprentissage visuel associatif et sa mémorisation soient largement observées chez les espèces butineuses de nectar.

Comme les abeilles, de nombreuses espèces de guêpes sont généralistes et collectent fréquemment du nectar de fleurs riche en glucides (Richter 2000; Brock et al. 2021). Les guêpes sont connues pour utiliser des stimuli visuels pour apprendre des lieux (Tinbergen 1932) et reconnaître des congénères (Sheehan and Tibbetts 2011). Des études récentes utilisant des méthodes de conditionnement appétitif ont aussi rapporté leur capacité de traiter des informations visuelles complexes (Avarguès-Weber et al. 2018) et d'apprendre des motifs (D'Adamo and Lozada 2011) et des couleurs (Balamurali et al. 2021). Cependant, on ne sait pas si les guêpes sont capables de réaliser un apprentissage puis de l'oublier au profit d'un autre. Cette flexibilité cognitive leur permettrait d'actualiser leurs pré-

férences en fonction d'un changement de qualité des ressources et de garder ces informations en mémoire pour optimiser leur trajet pour récupérer du nectar, comme cela a été bien étudié chez les abeilles (Gegear and Thomson 2004).

Dans ce sous-chapitre 2.1, j'ai étudié la flexibilité de l'apprentissage visuel et la mémoire à court terme des deux principaux frelons que l'on trouve en Europe : le frelon européen (*Vespa crabro*) et le frelon asiatique à pattes jaunes (*Vespa velutina nigrithorax)*. *V. crabo* est présent en Europe depuis au moins 200 ans (Janet 1895) tandis que *V. velutina* est invasif. Ce dernier a été repéré pour la première fois en France en 2004 et depuis, il s'est répandu dans toute l'Europe de l'Ouest (Monceau et al. 2014). C'est parce que ces frelons butinent occasionnellement sur des fleurs (Ueno 2015) que j'ai fait l'hypothèse qu'ils sont capables d'apprentissages visuels flexibles. Nous avons testé cette hypothèse en adaptant un protocole de conditionnement appétitif initialement développé pour étudier les abeilles (Howard et al. 2019) à l'aide d'un labyrinthe en Y semi-automatisé. Dans ce nouveau dispositif, les frelons de nids encagés devaient associer un signal lumineux d'une couleur à une récompense sucrée et un signal lumineux d'une autre couleur à l'absence de récompense pendant 10 essais. Ces mêmes frelons devaient ensuite apprendre la consigne inverse pendant 10 autres essais. Nous avons mesuré les frelons pour tester un potentiel effet confondant de la taille du corps sur les performances cognitives, récemment reporté chez les guêpes et les abeilles (van der Woude et al. 2018; Monchanin et al. 2021a). Nous avons aussi testé l'influence de l'intervalle de temps entre les essais, reflet de la motivation des insectes (Menzel et al. 2001) sur les performances d'apprentissage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Frelons

Nous avons capturé des nids sauvages de *V. crabro* (n=1) et de *V. velutina* (n=3) en juin-juillet 2022 (détails des sites et des dates dans le Tableau 2). Pendant cette période de l'année, les colonies étaient dans une phase de développement (Monceau et al. 2014) et donc hautement motivées à butiner. Nous avons sélectionné des colonies comparables en taille et en nombre d'individus pour nous assurer qu'elles avaient des besoins nutritionnels et une motivation similaires. Une fois les nids ramenés au laboratoire, nous les avons anesthésiés dans une chambre froide (4°C) pendant 24h. Nous avons marqué tous les adultes de chaque nid à la peinture acrylique avec un code couleur sur le thorax et l'abdomen pour permettre une identification individuelle. Nous avons ensuite transféré chaque nid dans une boîte en plastique (24 cm h x 32 cm l x 32 cm L – Figure 12A) et les avons conservés dans une chambre expérimentale à température ambiante (20-22°C). Nous avons fourni aux frelons des abeilles décongelées (source de protéines) et une solution sucrée à 40% (v/v) *ad libitum* directement dans les boîtes. Nous avons testé les colonies dans ces conditions contrôlées les unes après les autres dans une période de deux mois (voir Tableau 2 pour plus de détails).

Tableau 2

Date, origine des nids de frelons testés et leur composition.

Date de capture	Espèce	Ville (code postal)	Coordonnées GPS	Nombre d'adultes	Période de test
09/06/2022	*V. velutina*	L'Union (31)	43° 39′ 27″ N, 1° 29′ 07″ E	0-50	14/06/22-16/06/22
05/07/2022	*V. velutina*	Bouliac (33)	44° 48′ 57″ N, 0° 30′ 03″ W	0-50	06/07/22-12/07/22
20/07/2022	*V. velutina*	Bouliac (33)	44° 48′ 57″ N, 0° 30′ 03″ W	50-100	21/07/22-28/07/22
25/07/2022	*V. crabro*	Brax (47)	43° 36′ 53″ N, 1° 14′ 24″ E	0-50	29/07/22-09/08/22

Labyrinthe en Y

Nous avons connecté la boîte contenant chaque nid à un labyrinthe en Y en utilisant un tunnel en plastique (52 cm l, 2 cm Ø) dans lequel des portes permettaient de contrôler le flux de frelons entre la colonie et le labyrinthe (voir les détails dans la Figure 12B). Les frelons pouvaient entrer et sortir du labyrinthe par une porte tourniquet positionnée à l'entrée. La première branche du labyrinthe menait à deux branches perpendiculaires et identiques, chacune contenant un *feeder* à son extrémité. Le terme *feeder* en anglais correspond à une coupe d'alimentation. Nous utiliserons ce terme dans l'ensemble de la suite du manuscrit. Ici, le *feeder* était un tube transparent sans couvercle de 0,2 ml inséré dans le plancher du labyrinthe. De ce fait, l'intérieur du *feeder* n'était pas visible à distance par les frelons. En fonction du protocole d'entraînement, le *feeder* contenait soit une solution de sucre, soit de l'eau, soit il était vide (voir ci-dessous). Chaque extrémité des branches était éclairée par une lumière colorée LED, positionnée derrière un diffuseur (lumière bleue: λ = 465-467 nm, intensité = 180-200 mcd; lumière verte: λ = 522-525 nm, intensité = 660-720 mcd). L'activation de la porte tourniquet et des LEDs étaient contrôlée à distance par l'expérimentateur à l'aide d'une manette.

Pré-entraînement

Nous avons pré-entraîné les frelons à collecter une solution d'eau sucrée à 40% (volume/volume) dans un *feeder* placé à l'entrée du labyrinthe (Figure 12B). Pendant le pré-entraînement, nous avons laissé ouvertes les portes du tunnel transparent qui mène à la colonie pour permettre aux frelons de visiter le *feeder ad libitum*. Nous avons considéré que tous les frelons ayant effectué au moins trois visites au *feeder* en moins d'une heure d'observation sont des butineuses. Après avoir identifié une ou plusieurs butineuses, nous avons retiré la solution de sucre à l'entrée et nous avons commencé l'entraînement de ces individus.

Entraînement

Nous avons entraîné 20 butineuses de chacune des deux espèces au cours de deux protocoles de conditionnement visuel habituellement utilisés pour évaluer l'apprentissage et la mémoire des

abeilles (Avarguès-Weber et al. 2011). Nous nous sommes basés sur des observations préliminaires qui montraient que dans ce contexte de test en labyrinthe en Y, les frelons préféraient ingérer la solution d'eau sucrée plutôt que de l'eau seule (nous n'avons jamais observé de collecte d'eau). De ce fait, nous avons utilisé la solution d'eau sucrée comme renforcement positif et l'eau comme renforcement négatif. L'eau est communément utilisée par les guêpes pour construire le nids et pour la thermorégulation (Richter 2000). Nos colonies ayant été maintenues dans une chambre à température contrôlée, avec seulement un faible accroissement de la population, il est probable que les besoins en eau des colonie expérimentales aient été réduits par rapport à ce qu'ils auraient été en conditions naturelles.

Chaque frelon a été soumis à deux protocoles d'entraînement suivis d'un test de mémoire. L'ensemble a été, pour chaque individu, réalisé au cours de la même journée (moyenne ± erreur standard: 207.72 ± 63.23 min, étendue: 117-418 min, N = 20 frelons).

Conditionnement différentiel

Nous avons entraîné les frelons à associer une couleur A avec une récompense sucrée (stimulus conditionnel positif CS+) et une couleur B a une non-récompense d'eau (stimulus conditionnel négatif CS-) pendant 10 essais consécutifs (Giurfa 2007). Pendant le conditionnement différentiel, le stimulus conditionnel était associé sans ambiguïté à un stimulus inconditionnel ou à son absence. Ce protocole a été utilisé pour évaluer les capacités d'apprentissage des frelons.

Conditionnement inverse

Immédiatement après le conditionnement différentiel, nous avons entraîné les mêmes frelons à apprendre l'association opposée. De ce fait, la solution sucrée (CS+) était associée à la couleur B et l'eau (CS-) était associée à la couleur A pendant 10 essais supplémentaires (Raine and Chittka 2012). Dans le conditionnement inverse résulte une ambiguïté transitoire du stimulus quant au problème que l'insecte doit résoudre. Ce protocole a été utilisé pour évaluer la flexibilité cognitive des frelons.

A chaque essai de chaque protocole, CS+ et CS- ont été aléatoirement assignés dans une des branches du labyrinthe. Les frelons étaient libres d'entrer dans le labyrinthe quand ils étaient motivés, ce qui

signifie que l'intervalle entre les essais n'était pas contrôlé (n=800 inter-essais, moyenne ± erreur standard : 7.35 ± 6.71 min, étendue : 1-116 min). Nous avons nettoyé le labyrinthe avec de l'éthanol à 70% entre chaque essai pour nous assurer de l'absence de traces chimiques potentiellement laissées par les frelons.

Pour chaque frelon, nous avons calculé un score d'apprentissage pour le conditionnement différentiel et le conditionnement inversé en sommant l'ensemble des premiers choix des individus pendant 10 essais (Monchanin et al. 2021b) (0: seulement CS-, 5: aléatoire, 10: seulement CS+). Nous avons considéré le début d'un essai comme le moment où le frelon est entré dans le labyrinthe par le tourniquet. Nous avons considéré la fin d'un essai comme le moment où l'individu a collecté la solution sucrée (en premier ou second choix). Nous avons défini le premier choix comme étant le premier *feeder* (CS+ ou CS-) que le frelon a touché avec ses antennes à chaque essai et comme réussi lorsqu'il s'agissait de CS+. Pour chaque protocole, nous avons considéré les individus sélectionnant la solution sucrée en premier choix pendant le dernier essai comme « apprenants », comme cela a été fait dans les expériences sur les abeilles (Buatois et al. 2017; Cabirol et al. 2018; Geng et al. 2022).

Rétention en mémoire

Nous avons testé la mémoire à court terme (STM) une heure après le dernier essai du conditionnement inversé et ce, en utilisant les mêmes couleurs pour le CS+ et le CS-. Nous avons pu tester la mémoire seulement pour les *apprenants* motivés. Les frelons entraînés étaient autorisés à entrer à nouveau dans le labyrinthe et choisir entre les deux stimuli visuels mais dépourvus de solution sucrée ou d'eau. Nous avons considéré qu'un frelon avait mémorisé l'association quand il avait sélectionné le bras coloré comme CS+ et touché avec ses antennes ce *feeder* vide.

Morphométrie

Dans le but de contrôler un potentiel effet de la taille de la tête sur les performances d'apprentissage et de mémoire des frelons, nous avons réalisé des mesures morphologiques sur les frelons congelés avec le logiciel Toupview couplé à une Toupcam camera model U3CMOS et à un microscope de dissection (objectif x0.67) Nikon SMZ 745T. Nous avons mesuré la largeur de la tête comme approximation de la taille de la tête (Riveros and Gronenberg 2010). A noter que 4 des 20 *V. crabro* étant trop abîmés, nous les avons retirés de ces analyses.

Analyses statistiques

Nous avons réalisé l'ensemble des analyses sur R 4.0.4. A partir des données brutes, nous avons extrait le premier choix de chaque frelon à chaque essai (CS+ : 1, CS- : 0) du conditionnement différentiel et du conditionnement en inversion de consigne. Nous avons testé l'influence de l'espèce (*V. crabro* ou *V. velutina*) et des essais (1-10) sur le premier choix (CS+) en utilisant un modèle mixte généralisé (GLMM ; package *lme4* de R, Bates et al. 2015), avec une structure d'erreur binomiale et l'*identité* des individus en facteur aléatoire suivi par une ANOVA (package *car,* Fox and Weisberg 2019). Pour chaque protocole de conditionnement, nous avons comparé le nombre de frelons *apprenants* des deux espèces en utilisant un test du Chi2 avec une correction continue (fonction R *chisq.test*). Nous avons analysé l'effet de la largeur de la tête et de l'intervalle de temps entre les essais sur le score d'apprentissage (0-10) en utilisant un modèle linéaire mixte (package *lme4*) avec la *colonie* en effet aléatoire pour *V. velutina* et un modèle linéaire pour *V. crabro* puisque nous n'avons testé qu'une seule colonie de cette espèce.

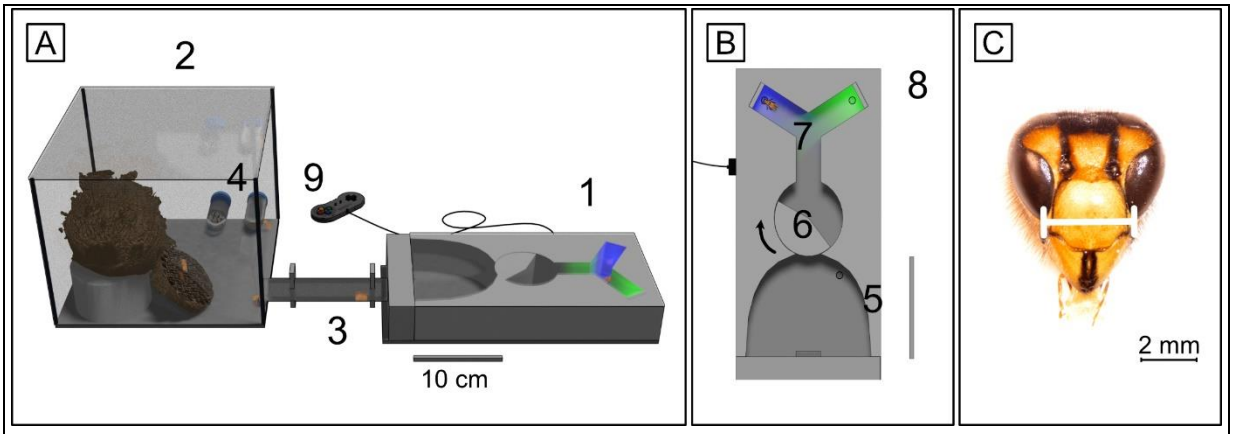


Figure 12
Labyrinthe en Y. A) Vue générale du dispositif expérimental. B) Vue détaillée du labyrinthe en Y. (1) La labyrinthe était connecté à (2) une boîte contenant le nid grâce à (3) un tunnel avec des portes. (4) Les *feeders* contenaient de la nourriture *ad libitum* (abeilles mortes et de la solution sucrée). Le labyrinthe a été creusé dans du Styrofoam et recouvert de plexiglass transparent. (5) *Feeder* de pré-entraînement. (6) Porte tourniquet d'entrée et de sortie. (7) Les *feeders* contenaient soit une solution sucrée (renforcement positif) soit de l'eau (renforcement négatif) associée à (8) une lumière LED colorée à travers un diffuseur (stimuli visuel). (9) Le tourniquet et les LEDs (activation/désactivation, changement de couleurs) étaient contrôlés par l'expérimentateur à l'aide d'une télécommande. C) Mesure de la largeur de la tête à partir de photos prises sous loupe binoculaire (ligne blanche).

RÉSULTATS

Nous avons d'abord évalué les performances d'apprentissage des frelons dans la tâche d'apprentissage différentiel lors de laquelle une couleur était récompensée et l'autre ne l'était pas (Figure 13A). Le pourcentage d'individus qui ont correctement choisi la récompense augmentait avec le nombre d'essais (GLMM binomial, essai : X^2=43,53, df=9, p<0,001) et de manière similaire pour les deux espèces (GLMM binomial, espèce: X^2=2,26, df=1, p=0,133). La proportion de *apprenants* était maximale et identique pour *V. velutina et V. crabro* (100%, 20/20 des frelons pour chaque espèce).

Nous avons ensuite mesuré la flexibilité cognitive des « apprenants » dans une tâche d'apprentissage en inversion de consigne où la couleur précédemment récompensée ne l'était plus et inversement (Figure 13B). Ici également, la proportion de frelons qui a choisi le stimulus récompensant augmentait au cours des essais (GLMM binomial, essai: X^2=0,53, df=9, p<0,001) et était similaire pour les deux espèces (GLMM binomial, espèce : X^2=0,59, df=1, p=0,407). La proportion d'*apprenants* était également comparable chez *V. velutina* (65%, 13/20 frelons) et chez *V. crabro* (70%, 14/20 frelons)

(X^2<0,001, df=1, p=1). Cependant, ces proportions étaient plus faibles que lors de l'apprentissage différentiel indiquant qu'il était complexe de surmonter l'ambiguïté transitoire des stimuli après l'inversion des contingences.

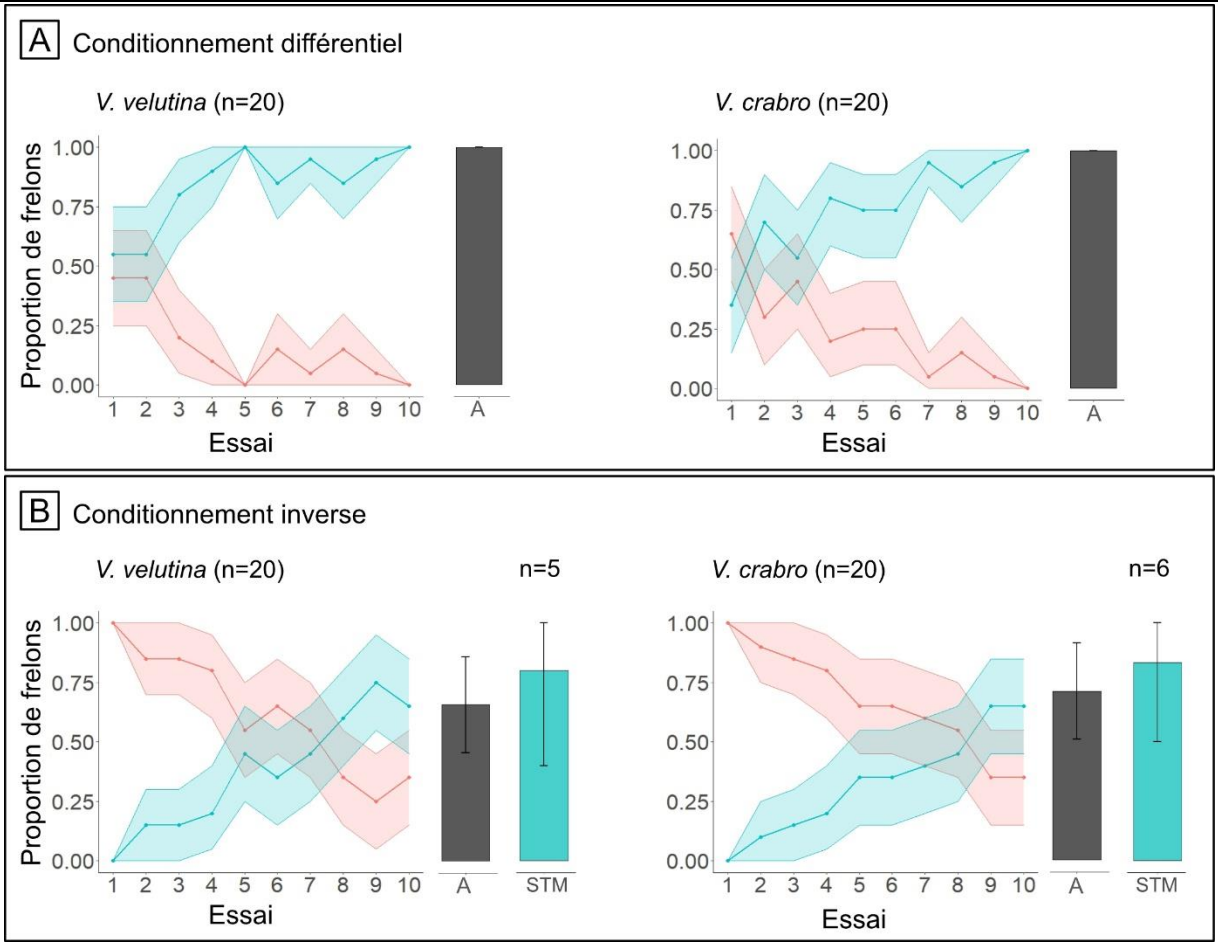


Figure 13
Courbes d'apprentissage pour le conditionnement différentiel (A) et en inversion de consigne (B) de *V. velutina* et *V. crabro.* Bleu: réponse à CS+. Rouge : Réponse à CS-. A : pourcentage de frelons *apprenants* qui ont répondu à CS+ au dernier essai. STM : Test de mémoire à court terme. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Dans les deux espèces, la plupart des *apprenants* a développé une mémoire à court terme de l'association couleur-récompense quand nous les avons testés une heure après la phase d'apprentissage inversée (*V. velutina:* 80%, n=4/5; *V. crabro:* 83%, n=5/6). Notre taille d'échantillon étant trop petite, nous n'avons pas réalisé de test statistique pour évaluer les différences entre les espèces.

En recherchant un potentiel facteur confondant, nous avons trouvé une importante variation dans la largeur de la tête des ouvrières de frelons (*V. velutina*: moyenne + erreur standard: 3,37± 0,13 mm, range: 3,12-3,54 mm, n= 20; *V. crabro:* 3,86 ± 0,19 mm, range: 3,33-4,07, n= 20) et dans l'intervalle de temps entre les essais (*V.velutina :* apprentissage différentiel : moyenne ± erreur standard : 9,36 ± 3,83 min, étendue : 5,6-21,9 min, apprentissage inverse: 8,03 ± 3,47 min, étendue : 2,6-13,8 min; *V.crabro:* apprentissage différentiel : 6,09 ± 1,18 min, étendue : 4,1-8,5 min, apprentissage inverse: 5,42 ± 1,84 min, étendue : 3,5-11,2 min). Cependant, aucun de ces paramètres n'a une influence significative sur les scores d'apprentissage (LMM, apprentissage différentiel: *V. velutina : largeur tête:* X^2=3,21, df=1, p=0,073, *intervalle essais :* X^2=0,0002, df=1, p=0,988; *V. crabro: largeur tête :* X^2=6,09, df=1, p=0,149, *intervalle essais:* X^2=1,42, df=1, p=0,472; LMM, apprentissage inverse: *V. velutina: largeur tête :* X^2=0,89, df=1, p=0,344, *intervalle essais:* X^2=0,71, df=1, p=0,398; *V. crabro: largeur tête :* X^2=4,25, df=1, p=0,353, *intervalle essais:* X^2=0,007, df=1, p=0,969).

DISCUSSION

Nous avons adapté un protocole de conditionnement appétitif standard dans les recherches sur l'abeille (Avarguès-Weber et al. 2011) pour explorer et comparer la flexibilité cognitive visuelle chez les frelons qui collectent du nectar. Les butineuses des deux espèces de frelon ont aussi bien réussi à apprendre la couleur associée à une récompense lors du conditionnement différentiel et de l'inversion de consigne. De plus, les frelons ont mémorisé ces associations. Cela suggère que ces formes d'apprentissage visuel et de flexibilité cognitive, déjà documentées chez les abeilles, sont répandues parmi les animaux qui fourragent sur des fleurs.

Les guêpes sont connues pour utiliser des indices visuels pour naviguer (Tinbergen 1932; Beier and Menzel 1972; D'adamo and Lozada 2003; D'Adamo and Lozada 2011) et pour communiquer (Sheehan and Tibbetts 2011; Baracchi et al. 2015b; Avarguès-Weber et al. 2018). Cependant, l'importance de l'apprentissage visuel et de la mémoire dans la sélection des fleurs est moins claire (Balamurali et al. 2021). Bien que nos conditions expérimentales soient similaires, les performances associatives visuelles des frelons sont comparables ou plus hautes que celles des abeilles (Giurfa 2004; Strang and Sherry 2014). Comme les abeilles, celles de *V. velutina* et *V. crabro* peuvent apprendre à associer une couleur avec une récompense sucrée et mémoriser cette association. Cette mémoire couleur-récompense permet vraisemblablement la constance florale, un comportement récemment décrit chez les frelons (Ueno 2015) et connu, chez les abeilles, pour améliorer le succès de fourragement (Gegear and Thomson 2004).

Nos résultats montrent que les frelons sont aussi capables de changer rapidement les associations apprises par de nouvelles. Ils peuvent ainsi ajuster leur préférence florale aux fluctuations naturelles de la valeur des récompenses florales à travers le temps. Ce type de flexibilité comportementale à l'échelle individuelle peut être critique pour un insecte qui doit adapter la collection de nutriments aux besoins fluctuants de la colonie. Ces besoins dépendent de la composition de la colonie (ex : ratio adulte / larves) et des conditions externes (ex : température ambiante) (Simpson et al. 2014).

Le fait que nous n'avons pas trouvé de différence entre les performances de *V. crabro* et *V. velutina* suggère que ces traits cognitifs sont des capacités basiques, partagées parmi les espèces qui se nourrissent de nectar, indépendamment des différences morphologiques (ex : taille du corps) ou de l'histoire invasive des espèces. Dans le cas de *V. velutina,* une compréhension plus détaillée des capacités cognitives impliquées dans l'exploitation des ressources pourrait aider à mieux prédire la dispersion de l'espèce (ex : en relation avec le type de nourriture et son abondance) ou développer de nouveaux outils pour le biocontrôle des populations. Par exemple, le conditionnement visuel pourrait être utilisé pour attirer les frelons dans des pièges ou les nourrir avec un appât contaminé qui pourrait agir comme un cheval de Troie (Poidatz et al. 2018b). Enfin, comparer les capacités cognitives à travers des espèces proches phylogénétiquement en utilisant des tests standards, réplicables, est critique pour comprendre les mécanismes écologiques qui guident l'évolution des traits cognitifs.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Stéphane Kraus pour avoir produit la Figure 12.

SOUS-CHAPITRE 2.2 : INTERATTRACTION DES FRELONS SUR LES SITES DE NOURRITURE

CONTRIBUTIONS

Mathilde Lacombrade[1,2,3,4], Mathieu Lihoreau[1], Jacques Gautrais[1,5], Blandine Mahot-Castaing[1], Edgar Ferrieu[3], Amelie Bourg[3], Hugo Cormier[1], Fanny Vogelweith[3]

[1] Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI); Université Paul Sabatier - Toulouse III, France

[2] UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRAe, F-33883 Villenave d'Ornon, France

[3] M2i Biocontrol, 370 route de Cauzenil, 46140 Parnac, France

[4] Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Université de Toulouse, CNRS, INPT, Toulouse, France

[5]Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie (LaPlaCE), CNRS, Université de Toulouse

MLa, MLi, FV ont mis en place le dispositif expérimental. MLa, BMC, EF, AB, HC ont collecté les données. JG et MLa ont analysé les données.

INTRODUCTION

Dans le sous-chapitre 2.1, j'ai démontré en conditions de laboratoire que les frelons étaient capables d'apprendre et de mémoriser des indices visuels de manière flexible afin d'accéder à une ressource alimentaire, comme le font de nombreux autres insectes pollinisateurs (Chittka and Raine 2006). Ces apprentissages sont dépendants de l'expérience individuelle. Comme le frelon asiatique est hautement social (division du travail entre plusieurs milliers d'individus dans une colonie), nous avons fait l'hypothèse que les frelons en charge de la collecte de nourriture utilisent également l'information sociale pour sélectionner les meilleurs sites.

Le partage d'information est un avantage majeur de la socialité (Krause and Ruxton 2002). Chez les insectes, il est fréquent que les individus qui découvrent une source de nourriture indiquent sa présence à leurs congénères de manière passive ou active (Lioni et al. 2001; Portha 2002; Dussutour et al. 2007; Lihoreau et al. 2010) et déclenchent un processus de recrutement. Ces informations sociales peuvent être chimiques (phéromone de pistes, Wilson 1962), visuelles (danse des abeilles, Frisch 1967) ou tactiles (*tandem running* chez les fourmis, Mglich et al. 1974) et agissent par boucle de rétroaction positive sur les individus recrutés. Ces derniers amplifient à leur tour ces signaux, ce qui conduit à l'exploitation d'une ressource principale parmi plusieurs autres par la majorité des individus (Detrain and Deneubourg 2008). Chez les abeilles et les fourmis, cette ressource est souvent la plus profitable (i.e. la plus large ou la plus riche en nutriments recherchés) pour la colonie (Jeanson et al. 2012). L'épuisement de la ressource ou le nombre limité d'individus dans une colonie constituent des boucles de rétroaction négatives qui permettent de stopper le phénomène d'amplification et l'expression du comportement en question. Ces comportements émergents (Wheeler 1928) résultent d'une auto-organisation dans laquelle des interactions simples et locales entre les individus produisent des comportements complexes globaux à l'échelle du groupe (Pasteels and Deneubourg 1987). Dans le cas de la recherche alimentaire, ces comportements collectifs sont le plus souvent adaptatifs puisqu'ils permettent des choix nutritionnels plus rapides et efficaces (Giraldeau and Caraco 2000; Krause and Ruxton 2002).

L'existence de décisions collectives dans un groupe animal peut être démontrée expérimentalement dans une situation dans laquelle un groupe choisit un site de nourriture parmi plusieurs autres possibles de qualité équivalente (Deneubourg and Goss 1989). S'il existe un choix collectif, ce choix émerge par de boucles d'amplification par lesquelles les individus s'attirent, se retiennent ou s'évitent les uns les autres (Detrain and Deneubourg 2008), créant ainsi des asymétries de distribution des individus entre les différents sites. La force du choix collectif (mesurée par le degré d'asymétrie) dépend alors de la taille du groupe, c'est-à-dire du nombre d'individus ou des interactions impliquées (Lihoreau et al. 2010). Ces effets taille de groupe peuvent être mis en évidence par des courbes d'agrégations qui montrent la fréquence de distribution des individus sur les différents sites possibles, et de diagrammes de bifurcation qui permettent de visualiser ces même distributions en fonction de la taille des groupes (Jeanson et al. 2012).

L'utilisation de l'information sociale dans un contexte de fourragement par les insectes a été particulièrement étudiée chez les fourmis et les abeilles (Detrain and Deneubourg 2008). Quelques études ont cependant mis en évidence des formes de recrutements passifs chez des guêpes du genre Vespula. Ainsi les guêpes *Vespula germanica* préfèrent fourrager sur des sites qui ont la même odeur que des individus précédemment retournés à la colonie avec cette même odeur (Overmyer and Jeanne 1998). Des fourrageuses de cette même espèce s'agrègent par des processus de renforcement locaux et un recrutement à distance de la source de nourriture (Lozada et al. 2016). Le choix de nourriture et la découverte des ressources par des fourrageuses naïves de *Vespula vulgaris* est influencée par les informations précédemment transmises par des congénères expérimentées dans le nid (Santoro et al. 2015).

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à des campagnes de piégeage d'ouvrières de frelons asiatiques avec l'entreprise M2i. J'ai observé que sur les ruchers où il y avait des pièges proches les uns des autres, la répartition des frelons capturés était inégale entre ces pièges. Certains

piégeaient un nombre important de frelons quand d'autres n'en piégeaient aucun (observation personnelle). A ma connaissance il n'existe qu'une seule étude démontrant la signalisation active d'une ressource chez un frelon, le frelon géant *Vespa mandarina japonica* qui marque les ruches d'abeilles avec une phéromone pour une attaque collective (Ono et al. 1995). Ici j'ai fait l'hypothèse de l'existence d'une influence sociale dans le choix du site de fourragement par les frelons asiatiques par l'utilisation de signaux visuels et/ou chimiques. Pour tester cette hypothèse, nous avons exposé des fondatrices et des ouvrières de frelons à deux pièges identiques et avons étudié la distribution des frelons dans ces pièges. Dans le cas d'une interattraction, nous nous attendions à observer une distribution asymétrique des frelons entre les deux pièges. Cette asymétrie serait d'autant plus prononcée que le nombre de frelons capturés serait élevé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sites et pièges

Les expériences se sont déroulées sur 30 sites localisés dans le sud-ouest de la France entre le 03/05/2023 et le 07/09/2023. Sur chaque site, nous avons placé deux pièges à frelons identiques à un mètre du sol (généralement accrochés à des arbres) et éloignés de 50 cm l'un de l'autre (piège 1 à l'emplacement A et piège 2 à l'emplacement B). Les pièges étaient des Smart Trap© fournis par M2i Biocontrol. Ils étaient constitués d'un bol contenant un appât et fermés par un couvercle en forme d'entonnoir (Ø16mm) avec un toit (Figure 14). La forme du couvercle en entonnoir permettait aux insectes de rentrer dans le piège mais pas d'en ressortir. Les pièges étaient transparents et ouverts ce qui permettait potentiellement aux frelons d'utiliser des signaux sociaux visuels et/ou olfactifs pour sélectionner un des deux pièges. L'appât dans le réservoir était composé à 50% de vin blanc, 25% de bière brune, 25% de sirop de fruits rouges (recette utilisée par les apiculteurs). Chaque piège contenait 50 cl de ce mélange.

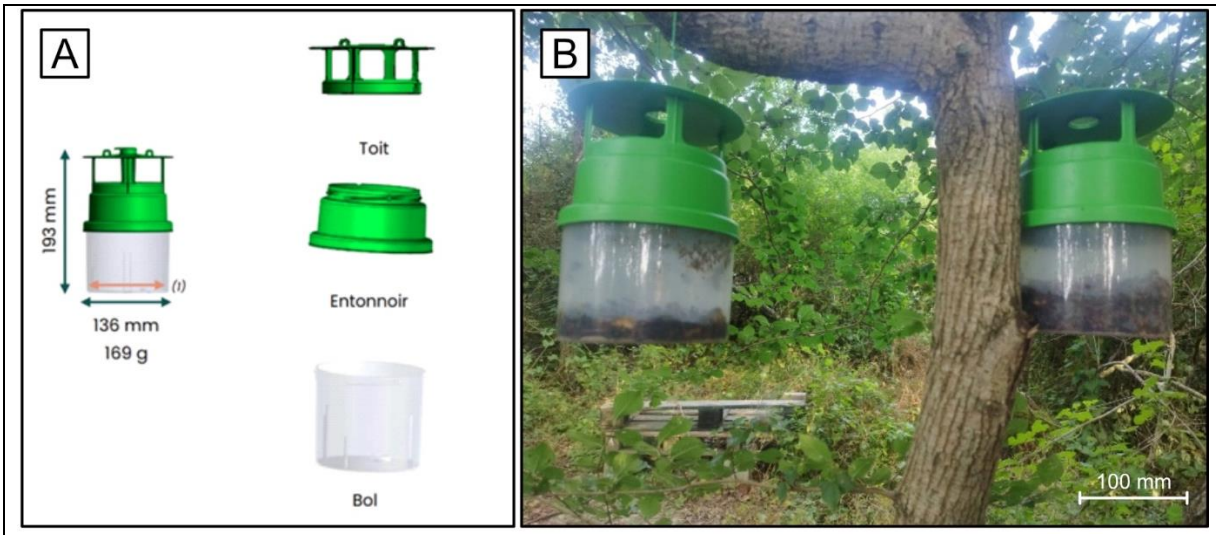


Figure 14
Pièges. A) Schéma 3D d'un Smart Trap© composé d'un bol, d'un entonnoir (Ø16mm) et d'un toit. (1) Diamètre intérieur du bol : 123,6mm. B) Deux Smart Traps © en situation expérimentale, placés à 50cm l'un de l'autre.

Expériences

Dans la suite du sous-chapitre, j'ai utilisé le terme « piège gagnant » pour désigner, sur un même site, le piège qui a capturé le plus grand nombre de frelons sur chaque période de piégeage.

Nous avons réalisé trois expériences. Dans la première expérience, nous avions pour objectif de tester la présence d'une interattraction entre les frelons. Pour cela, nous avons utilisé deux pièges strictement identiques sur 30 sites pendant les semaines 19-36, soit du 08/05/23 au 07/09/23. L'hypothèse d'une interattraction supposait qu'un des deux pièges devrait attirer systématiquement plus de frelons que l'autre. Nous avons testé cette hypothèse pour les fondatrices et pour les ouvrières de frelons. Nous avons distingué les fondatrices des ouvrières à posteriori en nous basant sur la période de capture (les fondatrices fourragent au printemps et les ouvrières en fin de printemps et été, Monceau et al. 2014) et sur la taille des individus capturés (les fondatrices sont plus grosses que les ouvrières, Rome et al. 2015). Pour cela, nous avons mesuré la distance maximale interoculaire (mesurée dans la Chapitre 1, Figure 8.1) de 5229 individus/8006 individus capturés à la semaine 29-32 (Figure 15), période charnière de l'émergence des premières ouvrières (Monceau et al. 2014).

Dans la seconde expérience, nous avions pour objectif de caractériser le niveau de spécificité de l'interattraction entre les deux espèces de frelons présentes sur les sites (*Vespa crabro* et *Vespa velutina nigrithorax*). Pour cela, nous avons capturé des ouvrières durant les semaines 32-36, soit du 07/08/23 au 07/09/23 en utilisant deux pièges dont un était amorcé avec 15 frelons asiatiques morts déposés dans l'appât sur huit sites. Ces frelons morts que nous utilisions comme leurres provenaient des précédentes captures. De ce fait, si les frelons étaient attirés par leurs congénères, ils auraient dû choisir préférentiellement le piège amorcé. Si cette interattraction était interspécifique alors le piège gagnant pour les frelons européens devrait être le même que celui pour les frelons asiatiques. Cette expérience est toujours en cours.

L'expérience 3 visait à évacuer un éventuel biais de piégeage qui aurait pu être issu du piège (1 ou 2) ou de son emplacement (A ou B). Pour cela nous avons interverti la position des pièges d'un

même site à chaque relevé. Le piège 1 positionné à l'emplacement A à la semaine n était donc positionné à l'emplacement B à la semaine n+1 et inversement pour le piège 2. Puisque l'emplacement des pièges changeait entre chaque relevé, si le piège 1 gagnait dans la moitié des cas, alors le biais de captures était lié à l'emplacement du piège et non au piège lui-même. Si le piège 1 gagnait systématiquement malgré le changement de son emplacement, alors le biais était lié au piège. Cette expérience est toujours en cours. Elle a démarré au début de la semaine 32, soit le 07/08/23.

Relevés

Sur chaque site, nous avons fait les relevés des pièges entre 3 à 14 jours après leur pose. Cette période était variable entre les différents relevés puisque nous souhaitions échantillonner la répartition des frelons dans les deux pièges pour des nombres de captures totales différentes (allant de 0 frelons au maximum atteignable). Pour les relevés, nous vidions les pièges et quantifions le nombre de frelons asiatiques et de frelons européens (les deux espèces d'insectes majoritaires dans nos pièges, 63,393% des captures parmi les Apidés et les Vespidés). Nous avons noté la présence d'autres vespidés et d'apidés capturés ainsi que d'autres ordres d'insectes présents dans les pièges (lépidoptères, diptères…). A partir de la semaine 31, nous avons évalué approximativement le pourcentage de bol occupé par l'amas d'insectes capturés (0-100%). A chaque relevé, nous avons rincé le bol à l'éthanol 90° et changé le liquide d'appât avant de réinstaller le piège.

Analyses statistiques

Nous avons réalisé les analyses avec R 4.0.4.

Dans l'expérience 1, nous avons testé la présence d'une interattraction entre les frelons avec un test de proportion sur chaque relevé, ce qui permet d'évaluer si la proportion de captures dans le piège gagnant est significativement supérieure à 0,5 (cas où les frelons seraient répartis équitablement entre les deux pièges) (fonction *binom.test*, package *stats,* R Core Team 2013). Ensuite, nous avons réalisé le même test par site (fonction *prop.test*, package *stats*, R Core Team 2013).

Dans l'expérience 2, nous avons testé l'influence des amorces sur le piégeage en quantifiant la proportion de pièges gagnants parmi les pièges amorcés. Puis, parmi les pièges amorcés gagnants, nous avons quantifié la proportion de ces pièges dans lesquels la proportion de frelons capturés était significativement supérieure à 0,5 en effectuant des tests de proportions sur chaque relevé.

Pour l'ensemble des tests de proportion, nous avons décidé de conserver les relevés dans lesquels le nombre de capture total dans chaque piège était faible pour ne pas opérer de sélection sur les données. De plus, ces données ne peuvent qu'augmenter le nombre de faux-négatifs et non celui de faux-positifs.

Dans les expériences 1 et 2, pour évaluer le niveau de spécificité de l'interattraction des individus, nous avons calculé la proportion de relevés dans laquelle les frelons asiatiques et les frelons européens étaient en plus grand nombre dans le même piège.

Dans l'expérience 1, nous avons voulu évaluer l'influence de la présence d'autres espèces (proies potentielles) (Vespidés, Apidés, Lépidoptères, Diptères…) (Villemant et al. 2011b; Monceau et al. 2015a) sur le nombre total de captures de frelons des deux espèces. Pour cela, nous avons réalisé un modèle linéaire mixte (LMM, distribution poisson ; package *lme4*, Bates et al. 2015) dans lequel, nous avons utilisé le *pourcentage de piège occupé par l'amas d'insectes capturés* en facteur fixe et le *site* en facteur aléatoire. Nous avons réalisé une Anova (fonction Anova, package *car*, Fox and Weisberg 2019) à la suite du modèle.

Dans l'expérience 3, nous avons voulu distinguer s'il y avait un biais de choix des frelons en fonction du piège ou de son emplacement. Pour cela, nous avons identifié l'emplacement et le piège qui gagnait le plus souvent et dans quelle proportion (nombre de relevés dans lequel l'emplacement X ou le piège X gagne sur le nombre de relevés total).

RÉSULTATS

Distinction des castes de frelons

Nous avons observé que la distance maximale interoculaire des frelons asiatiques diminuait à la semaine 23 et celle des frelons européens à la semaine 24 (Figure 15). Pour ne prendre en compte que les fondatrices ou les ouvrières des deux espèces, nous avons considéré que les données issues des relevés de la semaine 19 à 24 ne comportaient que des fondatrices et que les données au-delà de la semaine 33, que des ouvrières.

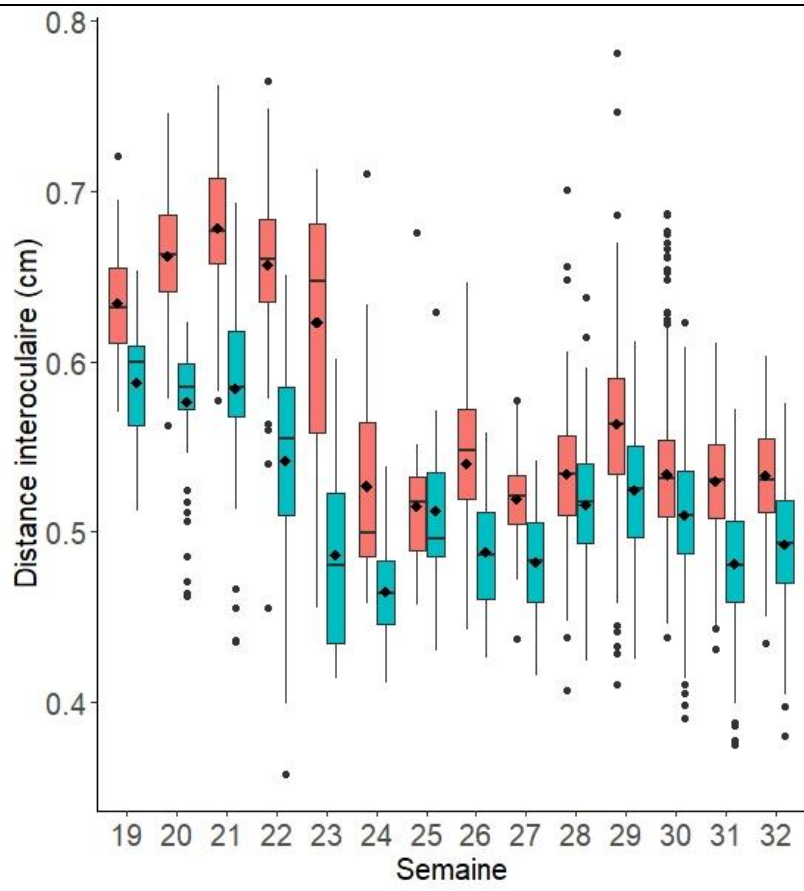


Figure 15
Distance maximale interoculaire des frelons (rose : *Vespa crabro,* bleu : *Vespa velutina nigrithorax*) capturés dans les pièges de la semaine 19 à 32 (soit du 08/05/23 au 07/08/23). Losange noir : moyenne.

Interattraction entre les fondatrices

Pour tester l'existence d'une interattraction entre les fondatrices, nous avons analysé la proportion de répartion des frelons capturés dans deux pièges identiques de la semaine 19 à 24, sans ségrégation des espèces. Pour 21,154% (11/52) des relevés (Figure 16, détail Annexe 4) et 33,333% (5/15) des sites (Tableau 3), la proportion de captures dans le piège gagnant était significativement supérieure à celle attendue par le hasard (proportion=0,5), ce qui est le signe d'une asymétrie. Dans la majorité des cas (87,097%, 27/31 relevés), le piège gagnant était le même pour les frelons asiatiques que pour les frelons européens. Sur certains sites, il existe une interattraction entre les fondatrices de frelons.

Interattraction entre les ouvrières

Pour tester l'existence d'une interattraction entre les ouvrières, nous avons analysé la proportion de répartion des frelons capturés dans les deux pièges identiques de la semaine 24 à 35, sans ségrégation des espèces. Le nombre de relevés dans lesquels la proportion de captures dans le piège gagnant était supérieure à celle attendue par le hasard (proportion=0,5) augmentait avec le nombre de captures totales dans les deux pièges ($n_{captures\ totales} < 100$: 25,743%, soit 26/101 des relevés) ; $n_{captures\ totales} > 100$: 54,879%, soit 34/62 des relevés) (Figure 16, détails Annexe 3). Pour la majorité des sites (66,667%, 20/30), la proportion de captures dans le piège gagnant était significativement supérieure à celle attendue par le hasard (proportion=0,5) (Tableau 3). De plus, dans la majorité des cas (73,881%, 99/134 relevés), le piège gagnant est le même pour les frelons asiatiques et les frelons européens. Sur la majorité des sites, il y a une interattraction entre les ouvrières de frelons.

Nous avons également testé l'influence de la présence d'autres espèces dans les pièges sur le nombre de captures de frelons. La quantité d'amas présent dans les pièges a positivement influencé le nombre de captures de frelons (LMM, *pourcentage d'amas :* $X^2=86,375$, df=1, $p < 0,001$).

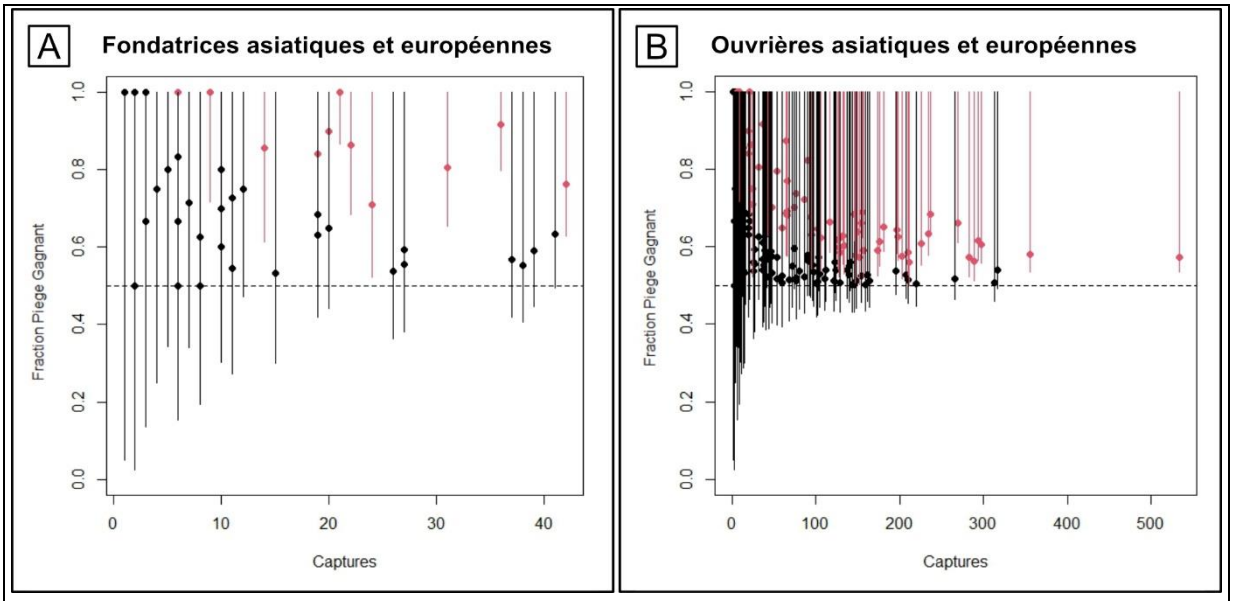


Figure 16

Fraction de captures des frelons dans le piège gagnant en fonction du nombre de captures totales dans les deux pièges, A) pour les fondatrices de frelon asiatique et de frelon européen, et B) pour les ouvrières de frelon asiatique et de frelon européen. Noir : résultat du test de proportion négatif ($p > 0,05$) et intervalle de confiance à 95%, rouge : résultat du test de proportion positif ($p < 0,005$) et intervalle de confiance à 95%. Pointillé : fration de captures des frelons dans le piège 1 égal à 0,5 ce qui représente un choix aléatoire.

Tableau 3

Résultats statistiques de l'expérience 1 sur les fondatrices et les ouvrières : test de la proportion de captures de frelons dans le piège gagnant et pour chaque site (tests de proportion, p). Zone blanche : résultat du test négatif (p > 0,05), zone grisée : résultat du test significatif (p < 0,05).

Site	**Fondatrices**	**Ouvrières**
	p-value	p-value
1	0,642	<0,001
2	0,162	0,315
3	0,086	<0,001
4	0,023	0,006
5	0,159	<0,001
6	0,007	<0,001
7	0,793	0,491
8	0,083	<0,001
9	0,488	0,001
10	0,003	<0,001
11	0,607	0,058
12	0,0842	<0,001
13	0,779	<0,001
14	0,003	<0,001
15	<0,001	<0,001
16		0,542
17		0,892
18		<0,001
19		0,007
20		0,004
21		<0,001
22		<0,001
23		0,243
24		0,025
25		0,299
26		0,576
27		<0,001
28		<0,001
29		0,221
30		1

Influence de la présence des frelons asiatiques sur le choix d'un site

Dans l'expérience 2, nous avions comme objectif de confirmer la présence d'une interattraction entre les ouvrières de frelons et de caractériser son niveau de spécificité. Pour cela, nous avons ajouté des cadavres d'ouvrières frelons asiatiques dans un des deux pièges de chaque site. La majorité de ces pièges amorcés a capturé le plus de frelons sur tous les sites. En effet, 15/19 (78,947%) des relevés comportaient un plus grand nombre de captures de frelons dans le piège amorcé et 8/15 (53,333%) de ces relevés reportaient une proportion de frelons significativement supérieure à celle attendue par le hasard (proportion=0,5) dans le piège amorcé (Figure 17, détails Annexe 4). Dans la majorité des cas (73,684%, 14/19 relevés), le piège gagnant était le même pour les frelons asiatiques et les frelons européens. Par conséquent l'interattraction entre ouvrières de frelons n'est pas spécifique.

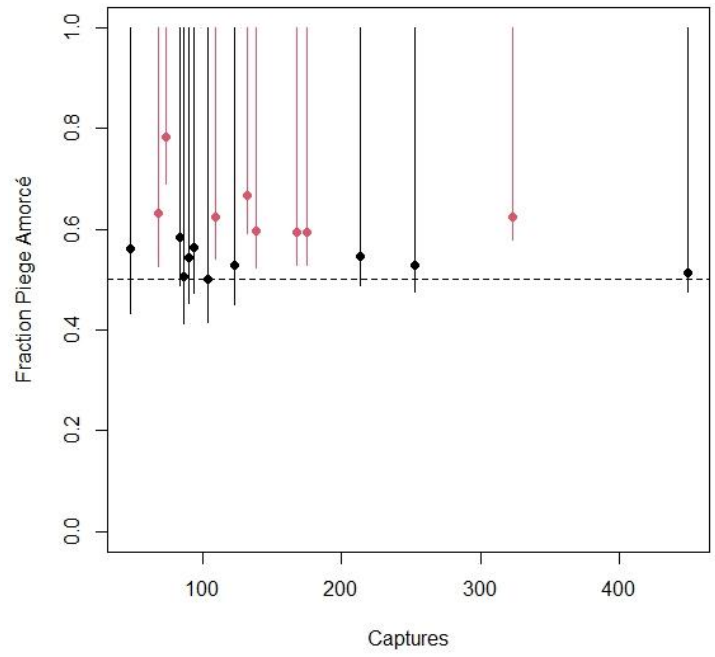


Figure 17
Fraction de captures des frelons dans le piège amorcé en fonction du nombre de captures totales dans les deux pièges. Noir : résultat du test de proportion négatif ($p > 0,05$) et intervalle de confiance à 95%, rouge : résultat du test de proportion positif ($p < 0,005$) et intervalle de confiance à 95%. Pointillé : fration de captures des frelons dans le piège amorcé égal à 0,5 ce qui représente un choix aléatoire.

Influence du piège ou de son emplacement sur le choix des sites

Dans l'expérience 3, nous avons testé l'existence d'un éventuel biais dans le choix des frelons lié au piège ou à son emplacement. Pour cela, nous avons interverti la position des pièges entre 5 relevés sur un même site choisi au hasard. Bien que le nombre de réplicats soit faible (expérience sur d'autres sites toujours en cours), nos résultats suggèrent que l'emplacement du piège a induit un biais de préférence dans le choix du piège par les frelons. En effet, sur le site 15, la majorité des relevés (80%, soit 4/5) a été piégée à l'emplacement B (Tableau 4). Le piège 1 a capturé plus de frelons dans un peu plus de la moitié des cas, soit 60% (3/5) de ces relevés (Tableau 4).

Tableau 4

Détails du nombre de captures de frelons sur 5 relevés du site 15 : nombre de captures de frelons dans le piège 1, nombre de captures dans le piège 2, emplacement du piège qui capture le plus de frelons. Zone grisée : piège ou emplacement qui a capturé le plus grand nombre de frelons.

Relevé	Nbr de captures piège 1	Nbr de captures piège 2	Emplacement du piège gagnant
1	92	75	A
2	107	79	B
3	38	96	B
4	131	70	B
5	137	185	B

DISCUSSION

Nous avons testé si les frelons asiatiques étaient attirés les uns par les autres sur les sites de fourragement. Pour cela, nous avons présenté aux frelons deux pièges identiques contenant un appât et avons étudié la proportion dans laquelle ils se répartissaient entre ces deux pièges. La majorité des sites montrent une distribution asymétrique entre les deux pièges. Plus le nombre de captures dans les pièges était grand, plus la distribution de captures entre les deux pièges était asymétrique. Ce phénomène est la signature d'une interattraction sociale entre des frelons, aboutissant à un fort taux d'agrégation dans un piège plutôt que l'autre. L'ajout d'amorces de frelons morts dans un des deux pièges semble biaiser le choix des frelons, ce qui confirme cette interattraction des individus. Enfin, cette influence sociale est interspécifique puisque l'agrégation de frelons asiatiques et européens a eu lieu, pour la majorité des cas, dans le même piège.

A ma connaissance, il n'existe qu'une seule étude démontrant la signalisation active d'une ressource chez une espèce de frelon, *Vespa mandarina japonica* (Ono et al. 1995). Dans cette espèce, des exploratrices marquent les ruches avec des phéromones pour attirer les congénères et permettre une attaque massive des abeilles. Ces dernières peuvent détecter la phéromone et y réagissent en augmentant le nombre d'abeilles défendant l'entrée de leur ruche. Ici, c'est la première fois que nous démontrons un recrutement chez le frelon *Vespa velutina nigrithorax* et *Vespa crabro.*

L'existence d'asymétries de distribution des fondatrices et des ouvrières sur la majorité des sites de captures (~67% des sites de l'expérience 1) témoignent d'un processus d'interattraction entre frelons. En accord avec la littérature chez d'autres groupes animaux (Jeanson et al. 2012), ces phénomènes chez les ouvrières sont d'autant plus marqués que le nombre de frelons total piégés atteignait les 100 captures. En augmentant le nombre de captures, nous sommes passés de ~26% ($n_{captures\ totales} < 100$) à ~55% ($n_{captures} > 100$) des relevés qui comportaient une accumulation significative dans un des deux pièges. Dans ces processus, la taille du groupe influence fortement l'intensité d'amplification du phénomène (Jeanson et al. 2012) et nous supposons que c'est pour cette raison que nous n'avons

observé cette intensification que chez les ouvrières de frelons et non chez les fondatrices puisque le nombre de leur capture totale n'a jamais excédé 42. Nos résultats d'amorçage avec des frelons asiatiques confirment les résultats précédents puisque ~84% des pièges amorcés ont accumulé plus de frelons que les pièges non amorcés.

Ces processus d'accumulation semblent être interspécifiques entre frelons asiatiques et européens. En effet, dans la majorité des cas, le piège qui a accumulé le plus de frelons asiatiques était celui qui a également accumulé le plus de frelons européens (~74% pour les fondatrices, ~67% pour les ouvrières). Ces résultats sont concordants avec les informations issues de la littérature qui démontrent la capacité de certaines espèces d'utiliser des informations sociales provenant d'une autre espèce lorsqu'il existe un bénéfice commun (Avarguès-Weber et al. 2013). Par exemple, les bourdons (*Bombus terrestris*) sont capables d'apprendre à localiser une ressource en utilisant aussi bien la présence d'autres frelons que d'abeilles domestiques (*Apis mellifera*) car les deux espèces se nourrissent du nectar et du pollen des même plantes (Dawson and Chittka 2012). Dans le cas des frelons asiatiques et européens, ils chassent tous les deux sur les même proies (i.e. abeilles) à des moments similaires de de la journée et de l'année (Monceau et al. 2015a; Cini et al. 2018). La présence d'individus d'une espèce à un endroit est informative et potentiellement bénéfique à l'autre espèce.

Les phénomènes d'interattraction sociale sont généralement observés en conditions de choix entre deux sites identiques. Bien que cela ait été le cas dans nos expériences en début d'observation, le choix des frelons a pu être influencé par l'accumulation de proies potentielles dans les pièges au cours du temps. En effet, ces pièges ne sont pas spécifiques et attirent aussi bien les frelons que d'autres espèces non cibles (principalement des Diptères et des Lépidoptères) prédatées par les frelons (Rojas-Nossa et al. 2018) (Villemant et al. 2011b). Nos observations sont similaires, les pièges que nous avons utilisés capturent une grande quantité de Lépidoptères et de Diptères. La présence de ces espèces influence significativement le nombre de frelons capturés mais nous ne savons pas dans quelle mesure elle biaise leur distribution. Pour le distinguer, nous pourrions amorcer certains pièges avec une espèce proie.

Dans les expériences que nous avons réalisées, nous ne pouvons pas non plus distinguer les mécanismes sous-tendant l'accumulation de frelons dans un des deux pièges. Il pourrait s'agir d'un recrutement actif en utilisant des indices chimiques comme cela a été démontré chez d'autres espèces de frelons (Ono et al. 1995) et/ou d'un recrutement passif simplement dû à la perception par les frelons de congénères présents dans le piège sans émission de signaux en particulier (Nieh 2009). Le fait que dans l'expérience 2, les amorces étaient des frelons morts et qu'ils aient attiré un plus grand nombre de frelons témoigne de l'existence d'un recrutement passif. Certaines espèces de guêpes s'agrègent préférentiellement sur des sites où elles perçoivent visuellement ou olfactivement des congénères (D'adamo et al. 2003). D'autres, comme les bourdons, sont capables de détecter la présence de trace chimique de leurs congénères (hydrocarbures cuticulaires) pour éviter un site de fourragement (Goulson et al. 2000). Il est également envisageable que les frelons soient attirés par l'odeur des cadavres des individus capturés plus que par des indices sociaux. Nous avons déjà observé des cas de cannibalisme nécrophage entre les frelons (inter- et intraspécifique) (observations personnelles). Les frelons ainsi que les autres insectes piégés et morts pourraient agir uniquement comme appât alimentaire qui grossit au cours du temps et non, dans le cas des frelons, comme attracteur social. Cet appât alimentaire composé de cadavres représenterait un apport protéique pour les frelons.

Pour déterminer ce qui attire les frelons entre eux, nous pourrions réaliser des expériences supplémentaires en testant différentes amorces composées de leurres visuels, chimiques ou les deux. Ici, bien que les agrégations observées aient eu lieu dans des conditions artificielles dans lesquelles les frelons ayant choisi un piège ne pouvaient pas en sortir pour choisir l'autre, nous avons également réalisé des expériences préliminaires qui montrent que ces agrégations de frelons ont lieu sur des sites de fourragement par des frelons en libre vol et dans leur environnement naturel. L'interattraction des individus favorise la création de groupes éphémères sur les sites de fourragement qui pourraient résulter de cette communication passive ou active. Ici encore nous avons observé le développement de groupes interspécifiques entre frelons asiatiques et européens sur les sites de nourriture en milieu naturel (Figure 18).

L'utilisation d'information sociale est bénéfique et adaptative dans un contexte naturel puisqu'elle favorise l'exploitation des ressources par les animaux (Lihoreau et al. 2017; Bose et al. 2017; Lemanski et al. 2019). Dans nos expériences de piégeage, nous avons démontré que ce processus naturel peut être utilisé pour attirer les insectes dans des pièges. Le comportement d'agrégation devient alors contre-productif pour les espèces piégées. Si nous identifions la nature des indices utilisés par les frelons pour être attirés par un congénère dans les pièges (visuel et/ou olfactif), nous pourrions utiliser des pièges contenant un grand nombre de leurres de frelons spécifiques (par le visuel et/ou l'odeur), ce qui devrait déclencher un phénomène d'amplification sociale et d'attraction des frelons qui seraient capturés en grand nombre par ce piège amorcé. Plus le nombre de leurres dans ce piège serait grand, plus le phénomène d'accumulation serait important. De nombreux apiculteurs ont déjà cette pratique basée sur des données empiriques. Ici, nous apportons la preuve de l'existence de ce phénomène d'interattraction entre les frelons et des prédictions liées à l'effet de la taille du groupe.

Une connaissance plus détaillée de l'utilisation des indices sociaux par les frelons asiatiques permettra de mieux comprendre le rôle de ses comportements de fourragement dans leur succès invasif, son impact sur le milieu et potentiellement de développer des pièges plus sélectifs qui utilisent ses comportements naturels.

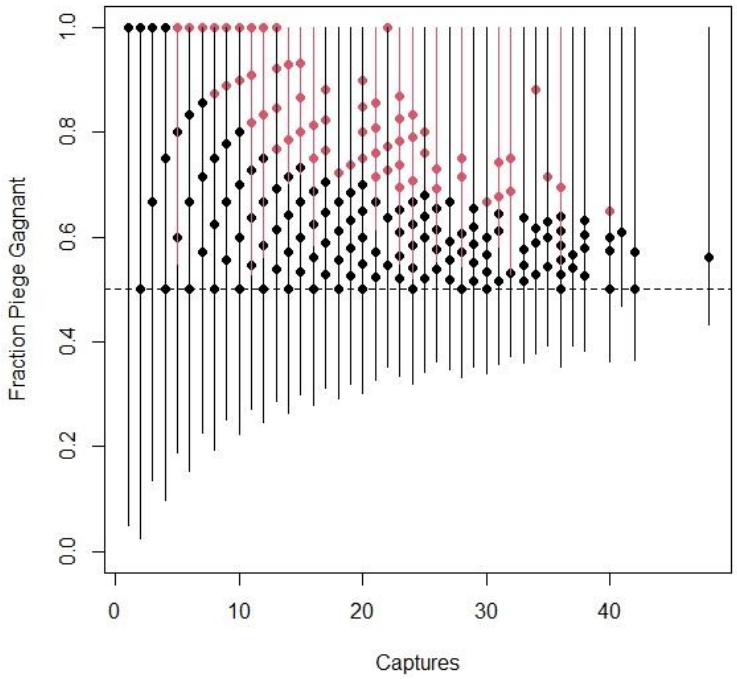


Figure 18

Fraction de captures des frelons dans le piège gagnant en fonction du nombre de captures totales dans les deux pièges. Noir : résultat du test de proportion négatif ($p > 0,05$) et intervalle de confiance à 95%, rouge : résultat du test de proportion positif ($p < 0,005$) et intervalle de confiance à 95%. Pointillé : fration de captures des frelons dans le piège 1 égal à 0,5 ce qui représente un choix aléatoire.

Ces expériences préliminaires ont été réalisées sur le rucher du CRCA pendant l'été 2022. Nous avons souhaité tester l'interattraction des frelons en milieu naturel. Pour tester notre hypothèse, nous avons déposé deux sources de nourriture identiques sur une table (composées de crevettes fraîches) et avons quantifié la répartition des frelons entre ces deux ressources. Si notre hypothèse était vraie, nous avons supposé observer une asymétrie de répartition des frelons entre les deux sources de nourriture. Les deux sources de nourriture étaient espacées de 50 cm l'une de l'autre. Pendant 15 jours, nous avons réalisé quatre heures consécutives d'expérimentation pendant lesquelles toutes les deux minutes, nous comptions le nombre de frelons asiatiques et européens présents sur chaque site de nourriture. Pendant ces quatre heures d'observation, nous avons pivoté la table de 90° afin d'éviter un biais de préférence pour un site en fonction de sa position dans l'espace. Sur ce site, le nombre de relevés dans lequel la proportion de captures dans le piège gagnant était supérieure à celle attendue par le hasard (proportion=0,5, $p<0,001$). Dans ces conditions de milieu naturel, nous avons observé une interattraction entre les ouvrières de frelons sur un site riche en ressource protéinée.

DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avions pour objectif d'étudier comment les frelons asiatiques utilisent les informations de leur environnement pour identifier et exploiter une ressource profitable de type nectar. Nous avons étudié séparément la mise en place de stratégies individuelles tels que l'utilisation d'indices visuels et les stratégies collectives qui émergeraient d'une attraction exercée par les congénères pour choisir un site de fourragement.

Dans le sous-chapitre 2.1, nos résultats démontrent que les frelons asiatiques sont capables d'utiliser des indices visuels pour identifier des ressources profitables en apprenant l'association entre un stimulus (ici, une couleur) et une récompense. Ces apprentissages sont flexibles, ce qui suggère qu'en cas de fluctuations environnementales, ces derniers sont capables de modifier leurs apprentissages pour exploiter de nouvelles ressources. De plus, la fidélité à un stimulus pour sélectionner une ressource souligne le potentiel pollinisateur du frelon asiatique : en se déplaçant sur des fleurs ayant les mêmes caractéristiques et donc potentiellement de la même espèce, les frelons pourraient participer à leur reproduction. Les frelons européens ont les mêmes capacités d'apprentissage testées ici que les frelons asiatiques.

Dans le sous-chapitre 2.2, nous avons également démontré que les frelons asiatiques utilisent des information sociales pour sélectionner des sites de fourragement. En effet, ces derniers s'agrègent sur un même site de fourragement (ici, un piège) puisqu'ils sont attirés par leurs congénères. Cette interattraction est interspécifique, au moins entre les deux espèces de frelons que nous avons testées. L'accumulation dans un piège plutôt que dans un autre semble pouvoir être biaisée par l'ajout de leurres dans les pièges.

L'ensemble des résultats de ce chapitre nous permet de conclure que les frelons asiatiques sont capables d'utiliser des informations liées à leur propre expérience de fourragement pour identifier un site de ressources profitables (Chapitre 2.1). De plus, ils sont attirés sur les sites de fourragement sur lesquels sont présents d'autres congénères (Chapitre 2.2). Cependant, nous ignorons dans quelles

mesures ces deux processus interagissent. Dans un environnement naturel, les ressources sont variables par leurs abondances, leurs qualités, leurs apparences et sont disponibles à des échelles spatiales et temporelles fluctuantes. Lorsque certaines ressources deviennent indisponibles ou peu bénéfiques, il faut qu'une fourrageuse puisse s'adapter à ce changement et en exploiter de nouvelles. Les capacités cognitives des frelons leurs permettent de modifier leurs apprentissages lorsqu'une ressource vient à disparaître et qu'une nouvelle apparaît (Chapitre 2.1). L'attraction exercée sur les frelons par leurs congénères (Chapitre 2.2) pourrait les attirer sur de nouveaux sites ou sources de nourriture et de ce fait, réduire les temps de recherche de nouveaux sites de fourragement profitables. En effet, chez le bourdon (*Bombus terrestris*), les fourrageurs naïfs bénéficient de la présence de congénères et des apprentissages sociaux pour détecter plus rapidement une ressource disponible (Kawaguchi et al. 2006). En fonction du contexte, l'utilisation conjointe des informations personnelles et sociales disponibles est flexible et permet d'optimiser les choix de fourragement (Rendell et al. 2010). En effet, les bourdons, par exemple, sont capables d'utiliser préférentiellement des informations personnelles ou sociales en fonction de la fiabilité de ces informations (Dunlap et al. 2016) ou de la difficulté de la tâche (Baracchi et al. 2018), ce qui leur assurerait un meilleur succès de fourragement. Dans le cas du frelon, aucune étude ne démontre la présence d'apprentissages sociaux mais nous pouvons supposer que ces apprentissages existent comme c'est le cas pour d'autres espèces de Vespidés (Lozada et al. 2016).

Bien que les capacités cognitives simples que nous avons testées ici sont équivalentes entre les frelons asiatiques et les frelons européens (Chapitre 2.1), nous avons démontré que l'attraction entre les frelons asiatiques était interspécifique (Chapitre 2.2). Le fait que les frelons asiatiques soient attirés par les individus de leur espèce et par d'autres frelons pourrait leur permettre d'être plus efficaces pour fourrager dans leur environnement, ce qui pourrait favoriser leur dispersion dans un environnement inconnu.

Dans ce chapitre, nous avons étudié ce qui permettait à un frelon de sélectionner un site de fourragement en conditions contrôlées ou de captures mais nous n'avons pu étudier ses réels mouvements dans l'environnement par manque d'outils adéquats. Nous testerons le potentiel d'un nouvel outil dans le chapitre suivant. Pour comprendre l'écologie du frelon asiatique, il serait intéressant de pouvoir suivre plusieurs frelons simultanément et en vol afin d'étudier leurs déplacements, leurs interactions et leurs répartitions dans l'espace dans un contexte de fourragement. De ce fait, nous pourrions étudier l'optimalité de leurs déplacements entre plusieurs sites d'intérêts et l'influence des congénères dans ces déplacements. Les bourdons (*Bombus terrestris*), par exemple, sont capables de trouver la route la plus courte pour visiter plusieurs sites de nourriture (Lihoreau et al. 2012). Nous pourrions également étudier le lien entre apprentissages personnels et influence sociale des congénères comme chez le bourdon, qui a ses préférences florales biaisée par la présence de congénères sur un site de nourriture (Worden and Papaj 2005).

CHAPITRE 3 : EVALUATION D'UN OUTIL RADAR POUR SUIVRE LES TRAJECTOIRES DE VOL ET DÉTECTER LES NIDS DE FRELONS

RÉSUMÉ

Mesurer les déplacements des insectes est essentiel pour étudier leur comportement et comprendre leur écologie. Un nouveau système de suivi radar à ondes millimétriques a été développé pour obtenir la trajectoire d'insectes volants avec une grande précision sur le terrain. A terme, ce système est envisagé pour étudier le comportement de fourragement des frelons asiatiques et localiser leurs nids. Dans ce chapitre, nous avons validé la détection radar de frelons en vol libre et en milieu naturel. Nous avons ensuite testé l'influence éventuelle des ondes électromagnétiques émises par les radars sur le comportement des insectes. Pour cette première approche, nous nous sommes focalisés sur le bourdon. Nous avons développé un protocole de conditionnement associatif avec des ondes électromagnétiques à 60Hz dans un labyrinthe en forme de T. Dans ce dispositif, les insectes n'ont pas associé le signal électromagnétique à une récompense sucrée, ce qui suggère qu'ils ne sont pas sensibles aux ondes électromagnétiques. En revanche, le fait qu'ils aient associé avec succès une couleur à une récompense sucrée confirme la possibilité d'apprendre dans ce dispositif. D'autres types d'ondes, par exemple des ondes modulées en amplitude, seront testées afin de pouvoir définitivement conclure à la non-détection des ondes électromagnétiques millimétriques par les bourdons et autres hyménoptères volants, parmi lesquels les frelons.

CHAPITRE 3 : EVALUATION D'UN OUTIL RADAR POUR SUIVRE LES TRAJECTOIRES DE VOL ET DÉTECTER LES NIDS DE FRELONS

CONTRIBUTIONS

Lacombrade Mathilde[1234], Dominique Henry[4], Blandine Mahot-Castaing[1], Gabriel Madirolas-Perez[1], Etienne Dedic[4], Loïc Goulefert[1], Laurène LeBreton[1], Alexandre Dore[14], Mathieu Lihoreau[1], Hervé Aubert[4]

[1] Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI); Université Paul Sabatier - Toulouse III, France

[2] UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRAe, F-33883 Villenave d'Ornon, France

[3] M2i Biocontrol, 370 route de Cauzenil, 46140 Parnac, France

[4] Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Université de Toulouse, CNRS, INPT, Toulouse, France

MLa, DH, AD, MLi, HA ont mis en place le dispositif expérimental. MLa, BMC, DH, ED, LLB, AD ont collecté les données. MLa, GMP, LG, DH, ED et AD ont analysé les données avec l'aide de GMP et LG.

J'ai présenté ces résultats sous forme d'une communication orale au congrès de l'école doctorale GEET :

- **Lacombrade et al. 2023**, Do bumblebees use millimeter electromagnetic waves when foraging? *Congrès de l'école doctorale GEET,* 1er juin 2023, Toulouse, France

Dans la suite du manuscrit, nous avons à certain endroit utilisé le bourdon (*Bombus terrestris*) comme modèle d'étude. Nous avons justifié son utilisation dans un article soumis et accepté dans la revue *Apidologie* : Lihoreau M., […], **Lacombrade M.,** […] 2022, Why bumblebees have become model species in apidology: a brief history and perspectives

INTRODUCTION

Dans le chapitre 2, nous avons étudié différentes sources d'information permettant à un frelon de sélectionner un site de nourriture sur le terrain et en laboratoire. L'objectif du chapitre 3 était de développer une nouvelle méthode pour étudier en détail les mouvements et interactions des frelons dans leur environnement naturel. Comprendre l'écologie et les comportements de fourragement des frelons serait un grand pas pour évaluer leurs impacts réels sur les écosystèmes et développer des méthodes de lutte. Pour cela, plusieurs outils de quantification du comportement, à travers le suivi de trajectoires de vol, ont été développés. Parmi ces systèmes, on compte les systèmes vidéos (Fry et al. 2000), le RFID (*Radio-Frequency Identification*) (Poidatz et al. 2018c), la radio-télémétrie (Kennedy et al. 2018) et les radars (Riley et al. 1996; Dore et al. 2020). Les systèmes basés sur la détection radars sont les plus prometteurs.

A partir des années 1990s, des systèmes de radars harmoniques ont été développés pour suivre la trajectoire d'abeilles à de grandes échelles spatiales (<900 mètres) (Figure 19A) (Riley et al. 1996; Osborne et al. 1997). Ces radars émettent des ondes électromagnétiques (25 KW, 9,37 GHz) qui sont reçues et réémises par une antenne posée sur la cible en mouvement. Les radars réceptionnent à leur tour ces ondes qui permettent d'estimer la position de la cible en deux dimensions. Bien que ces radars représentent une grande avancée pour l'étude de petits insectes volants en milieu naturel, les abeilles détectées doivent être équipées d'une grande antenne fixée sur leur thorax qui peut modifier leur aérodynamisme (Tahir and Brooker 2011). De plus, le suivi de trajectoire avec un radar harmonique est limité à la détection d'une trajectoire en deux dimensions et à faible résolution spatio-temporelle (<1,5 mètres, 1 image/3 secondes), d'une seule abeille à la fois et sur un terrain plat. Par ailleurs, ce système est très cher (>150K€) et peu mobile (4 x 4 x 2 m). Ces contraintes ont longtemps restreint l'étude des déplacements et des interactions entre les insectes en conditions naturelles. Un radar harmonique a été développé pour s'adapter aux contraintes qu'exigent ces études sur les insectes sauvages comme le frelon asiatique (Monceau et al. 2014). Ce radar couvre un champ plus large en élévation, ce qui

permet de suivre les individus à de plus hautes altitudes et dans des zones végétales plus denses (Maggiora et al. 2019; Lioy et al. 2021b). Malgré tout, il comporte les mêmes contraintes que les précédents: la détection reste possible sur un seul individu, en deux dimensions et l'insecte doit être équipé d'un transpondeur susceptible d'affecter sa motricité (Figure 19B).

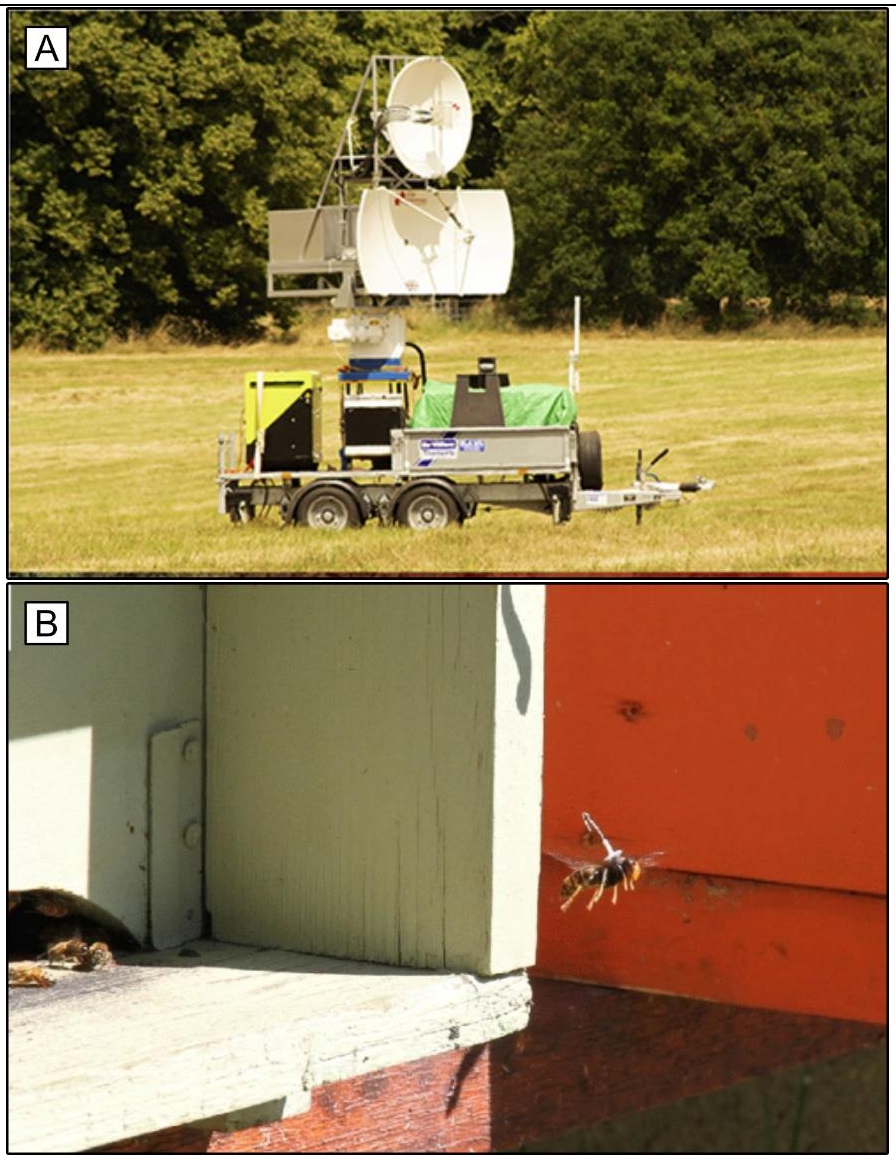


Figure 19
Radars et transpondeurs pour suivre la trajectoire d'insectes volants. A) Radar harmonique, source : photo extraite et modifiée d'après Woodgate et al. 2021, B) Frelon asiatique équipé d'un transpondeur pour suivre sa trajectoire avec un radar harmonique, source : photo extraite et modifiée d'après Lioy et al. 2021.

Plus récemment, pour pallier ce problème, nous avons développé un nouveau système de suivi à base de radar à ondes millimétriques continues et à fréquence modulée (FMCW, *Frequence-Modulated Continuous-Wave*) (Encadré 1) opérant à 77,5 GHz. Le radar a été développé dans le cadre d'une collaboration entre le CRCA-CBI et le LAAS-CNRS (Projets Région Occitanie SIDIPAR 2019-2021, ANR 3DNaviBee 2020-2023). Nous avons utilisé ce système pour suivre la trajectoire de plusieurs insectes volants, sans antennes, en trois dimensions et avec une haute résolution temporelle (16 images/secondes, précision: 3 cm) (Dore et al. 2020; Dedic et al. 2023). Les bandes de fréquences émises par ce radar sont très utilisées pour des applications automobiles et industrielles (véhicules autonomes et détecteurs anticollision). Ces radars sont peu chers (quelques milliers d'euros) et très mobiles. Bien que la portée de détection soit courte (2 mètres) comparée à la taille de l'aire de fourragement des abeilles ou des frelons (plusieurs centaines de mètres voire plusieurs kilomètres) (Goulson and Stout 2001; Poidatz et al. 2018c), ce nouveau système est très prometteur pour l'étude détaillée du comportement des abeilles et autres insectes volants tels que le frelon asiatique. Cependant, la détection avec ce radar des frelons, plus rapides et plus gros que les abeilles, n'a jamais été testée. A terme, il est envisagé que ce système soit amélioré pour augmenter les portées et, par exemple, permettre d'étudier les comportements de chasse et de butinage des frelons, les interactions compétitives entre les frelons, voire de localiser les nids avec un niveau de précision inégalé.

L'objectif de cette étude est de tester la viabilité de notre nouveau système de suivi automatisé par détection radar pour l'étude du vol des insectes, et en particulier des frelons asiatiques. Dans un premier temps, nous avons testé la possibilité de détecter des frelons avec les radars FMCW. Dans un deuxième temps, nous avons testé si les insectes étaient capables de détecter les ondes émises par le radar. Des études récentes montrent que les abeilles domestiques et les bourdons sont sensibles aux champs électrostatiques de faible amplitude qui entourent les plantes et que ces insectes peuvent utiliser ces champs pour prendre des décisions de fourragement (Clarke et al. 2013). Les bourdons, par

exemple, peuvent détecter ces champs pour discriminer différents types de fleurs et visiter le plus de fleurs récompensées (Clarke et al. 2013). Les abeilles sont quant à elles, capables de discriminer des champs électriques grâce aux mouvements qu'ils induisent sur leurs antennes (Greggers et al. 2013). Si les insectes sont effectivement capables de détecter les ondes émises par les radars, alors le concept de suivi des trajectoires de vol par système radar sera remis en cause car les ondes pourraient perturber leur comportement. Dans le cas contraire, notre nouveau système constituera une avancée majeure. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis en place des expériences d'apprentissage en laboratoire dans lesquelles les insectes devaient associer la présence ou l'absence d'ondes électromagnétiques (Encadré 2) à une récompense sucrée dans un labyrinthe en T. Pour des raisons pratiques, dans cette étude pilote, nous nous sommes focalisés sur le bourdon qui est proche phylogénétiquement des guêpes (ordre des Hyménoptères) est plus facile à manipuler en laboratoire que les frelons. Nous avons estimé que cela nous apporterait des réponses préliminaires quant à la capacité des Hyménoptères, et donc des frelons à détecter ces ondes.

Encadré 1 : Principe du radar FMCW (*Frequence Modulated Continuous Wave*)

Ce radar est composé de deux réseaux d'antennes. Le premier émet des ondes électromagnétiques modulées en fréquence qui sont renvoyées passivement par la cible et reçues par le second réseau d'antennes (Figure XA). C'est le décalage temporel (Figure 20B) entre l'émission et la réception des ondes qui permet d'estimer la distance à laquelle se trouve la cible. La présence du réseau statique d'antennes permet d'estimer, dans un plan, la direction dans laquelle se trouve la cible. La combinaison de ces deux informations (distance et direction dans un plan) permet de déterminer la position de la cible en deux dimensions. Un réflecteur tournant est ajouté au-dessus du radar afin de sonder l'espace dans plusieurs plans de coupe et d'estimer ainsi la position de la cible en trois dimensions et au cours du temps.

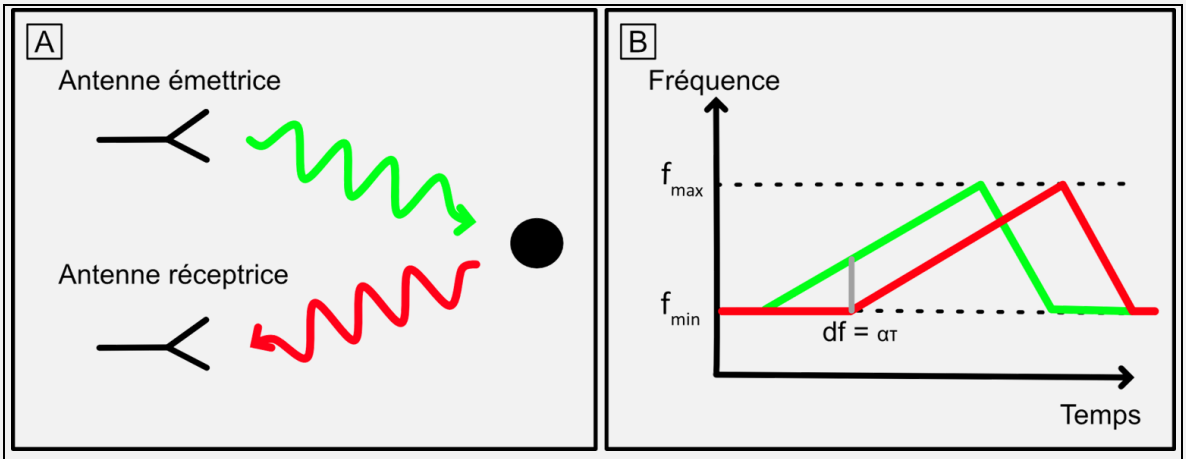


Figure 20

Ondes émises et reçues par les antennes d'un radar FMCW. A) Emission (vert) et réception (rouge) d'ondes électromagnétiques par des antennes émettrices et réceptrices. B) Fréquence d'ondes électromagnétiques émises (vertes) et reçues (rouges) par les antennes au cours du temps. L'écart de fréquence est le même au cours du temps et dépend de la distance de la cible. Source : modifié d'après la thèse d'Alexandre Dore (2022)

Encadré 2 : Principe des ondes électromagnétiques

Les ondes électromagnétiques correspondent aux oscillations couplées d'un champ électrique et d'un champ magnétique perpendiculaire se propageant dans le vide ou l'air dont les amplitudes varient au cours du temps (Figure 21). Ces ondes transportent de l'énergie et elles sont aussi capables de transporter de l'information. Elles sont principalement utilisées dans le domaine de la communication (radars, antennes téléphoniques).

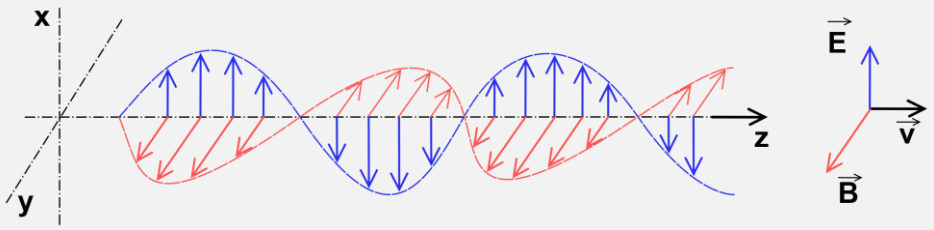


Figure 21

Propagation d'une onde. V=vitesse de déplacement de l'onde, E=champ électrique, B=champ magnétique © Emmanuel Boutet/Wikimedia Commons

Expérience 1 : Détection des frelons asiatiques par le radar FMCW

Dans cette première expérience, nous avons testé la capacité du radar FMCW à suivre la trajectoire de frelons en vol libre et dans leur milieu naturel.

Lieu d'étude

Nous avons réalisé cette expérience au rucher expérimental du CRCA (Toulouse, France) en octobre 2022. Nous avons sélectionné une zone dépourvue d'objets métalliques (ruches, barrières de sécurités, tunnel de vol etc.) susceptibles de générer un fort écho des ondes électromagnétiques afin de réduire les signaux parasites.

Frelons

Les frelons asiatiques sont abondants au rucher du CRCA du mois d'août au mois de novembre car ils chassent les abeilles domestiques. Nous avons attiré les frelons naturellement présents au rucher à l'emplacement que nous avions sélectionné. Pour cela, nous avons utilisé un appât composé de crevettes fraîches (achetées le matin même) que nous avons déposé dans une assiette plate posée à 80 cm du sol sur un support en bois (Figure 22A, 22B).

Radar

Pour suivre le mouvement des frelons sans *tags*, nous avons utilisé un radar FMCW opérant à 77,5 GHz, identique à celui développé et capable de suivre la trajectoire de bourdons (Dore et al. 2020). Nous l'avons positionné à 1 mètre de l'assiette de crevettes et à 80 cm de hauteur afin de centrer le volume de détection autour de l'appât et donc de maximiser les probabilités d'enregistrer les mouvements des frelons (Figure 22A, 22C).

Expérience

Une fois que nous avons attiré quelques frelons (2 à 5) au niveau de l'assiette contenant l'appât, nous avons enregistré la trajectoire de vol des frelons présents lorsque ces derniers allaient et venaient librement se poser dans l'assiette. Aucun de ces individus n'était équipé de *tags.* Chaque enregistrement durait environ 5 minutes.

Extraction et analyses des données

Pour extraire les trajectoires de frelons à partir des mesures radar, nous avons utilisé l'algorithme MUSIC (MUltiple SIgnals Classification) couplé à un balayage mécanique pour estimer la trajectoire des frelons en trois dimensions, selon Dore et al. (2020).

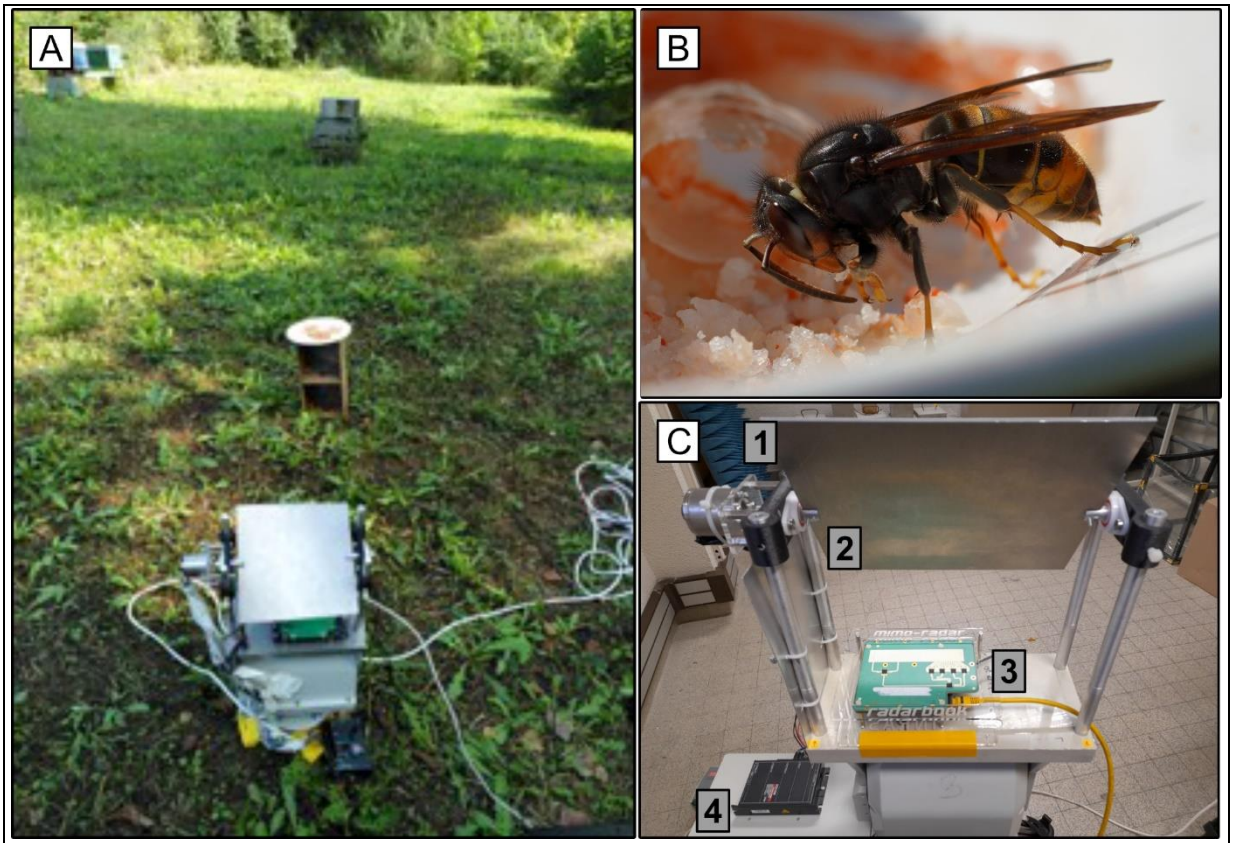


Figure 22
A) Dispositif expérimental de l'expérience 1, source : Alexandre Dore et Dominique Henry : B) Frelons venant se nourrir de l'appât, source : Louise Bestea, C) radar FMCW utilisé pour enregistrer la trajectoire des frelons : (1) Moteur, (2) Réflecteur tournant permettant l'obtention de trajectoires en trois dimensions, (3) Radar à ondes millimétriques RadarBooK2 (RBK2), (4) Pilote du moteur, source : Etienne Dedic.

Expérience 2 : Détection des ondes électromagnétiques par les bourdons

Après avoir validé l'utilisation du radar FMCW pour le suivi des trajectoires de vols de frelons asiatiques, nous avons voulu nous assurer que son utilisation ne perturbait pas les comportements des insectes. Pour cela, nous avons testé la détection des ondes électromagnétiques par des bourdons. L'utilisation des bourdons a été motivée par la plus grande facilité à les utiliser en conditions de laboratoire, et ceci toute l'année.

Lieu d'étude

Les expériences ont été réalisées dans une pièce (9 m²) localisée au rucher du CRCA (Toulouse, France) du mois de février à août 2023. Cette pièce était maintenue à une température aux alentours de 26±4°C. Pour limiter la présence d'ondes qui interfèreraient avec les ondes électromagnétiques des radars pendant nos expériences, les téléphones portables et le wifi étaient éteints sur toute la zone du rucher (3000m2).

Bourdons

Nous avons utilisé 6 colonies de bourdons terrestres *Bombus terrestris* (Koppert, Pays-Bas). Nous avons maintenu chaque colonie dans une boîte en bois divisée (Figure 23A) en deux compartiments à une température (26°C) et une humidité constante (60%) et sous une lumière artificielle (© Intereurope Light LL-GN2715F-E27-15W, 60/70 Hz, 70 mA, 1250 lm, 6400°k, 190°). Nous avons fixé sur le thorax des bourdons un dossard coloré avec un numéro pour identification individuelle. Les colonies de bourdons étaient nourries *ad libitum* avec une solution d'eau sucrée (30% v/v) et du pollen collecté par les ouvrières. Nous avons testé les colonies de manière séquentielle, une après l'autre sur une période de sept mois.

Labyrinthe

Nous avons connecté chaque colonie de bourdon à un labyrinthe en T (prototype réalisé au CRCA, Figure 23A) grâce à un tunnel constitué d'un tube en plastique transparent et de portes pour

réguler le flux de bourdons entrant et sortant. Le labyrinthe était constitué d'une aire de pré-entraînement dans laquelle les bourdons pouvaient s'alimenter dans un *feeder* (ici, il s'agit d'un trou dans le plancher contenant un micro-tube de 1,5 ml) fournissant de l'eau sucrée (30% v/v). L'aire d'entraînement (Figure 23A et 23B) était composée d'une branche principale ($longueur_{branche\ principale}$ = 25,5 cm) qui conduisait à deux autres branches symétriques ($longueur_{branche\ secondaire}$ = 30 cm) et strictement équivalentes (formant le T du labyrinthe). Les deux branches contenaient un *feeder* à leur extrémité et étaient éclairées par deux radars à 60 GHz (Figure 24). En fonction du protocole de conditionnement, le *feeder* contenait soit de l'eau sucrée (30% v/v) soit de l'eau non sucrée. Le plancher et les murs du labyrinthe étaient constitués d'un plastique blanc opaque. Le labyrinthe en T était placé sur une table (longueur=2m) percée sur 21 cm le long des branches et sous le labyrinthe (Figure 24A). Les radars étaient installés sous la table et leurs ondes illuminaient le labyrinthe seulement aux endroits où la table était percée (Figure 24B).

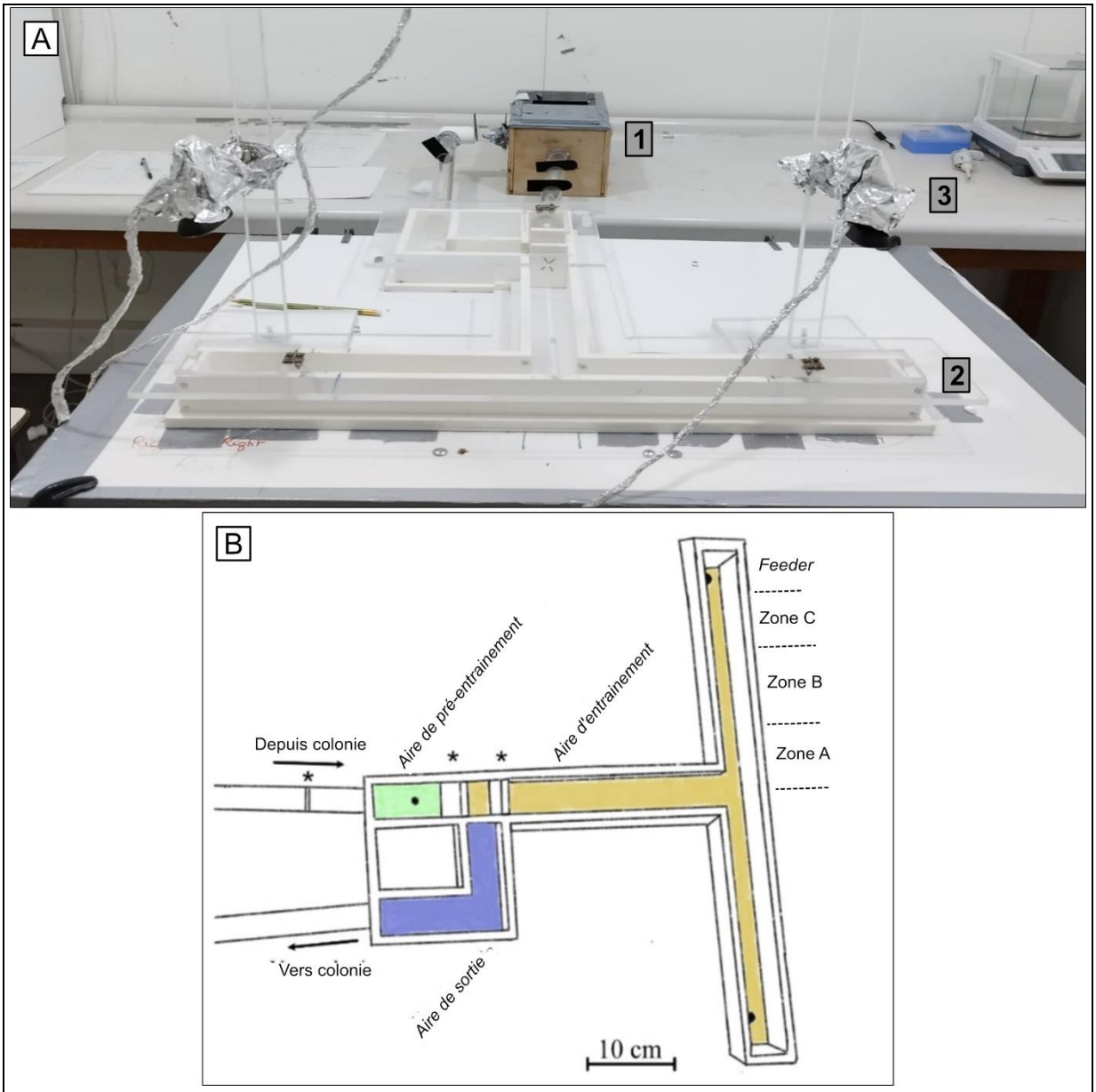


Figure 23
Labyrinthe en T. A) Vue générale du dispositif expérimental : (1) la colonie de bourdons était connectée au (2) labyrinthe en T et les déplacements étaient filmés par (3) des caméras, source : Laurène LeBreton, B) Détail de la délimitation des zones dans le labyrinthe (zones A, B, C, *feeder* : symétriques dans les deux branches).

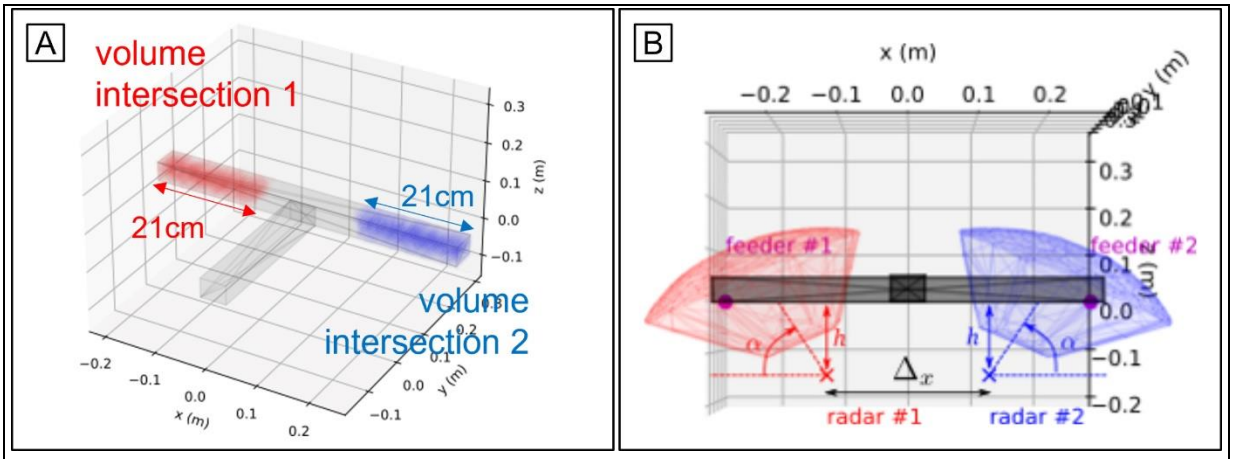


Figure 24
Zones du labyrinthe éclairées par les ondes radars millimétriques. Volume d'intersection dans les branches du labyrinthe correspondant aux zones que le radar éclaire dans le labyrinthe, A) vue latérale et B) vue frontale.

Radars

Nous avons utilisé deux radars FMCW émettant un signal d'une puissance de 10 dBm à une fréquence porteuse de 60 GHz(Figure 24B). Ces radars émettaient des ondes millimétriques modulées en fréquences similaires à celles des radars 77GHz précédemment utilisés pour suivre les bourdons (Dedic et al. 2023) et les frelons (expérience 1). Pour augmenter le volume d'illumination, nous avons retiré les lentilles des radars, créant ainsi un réseau de patchs d'antennes de longueur D=5mm, $2D^2/\lambda$ = 9.5mm, θ_A=60°, ϕ_A=65° (Figure 24B).

Conditionnement

Au cours d'un pré-entraînement, nous avons laissé les bourdons se nourrir *ad libitum* d'une solution sucrée dans la zone de pré-entraînement du labyrinthe en T (Figure 23B). La zone d'entraînement était alors fermée. Nous avons considéré que tous les bourdons qui ont effectué au moins trois visites à ce *feeder* en l'espace d'une heure étaient des butineuses régulières. Nous avons ensuite procédé à un conditionnement (Giurfa 2004) de ces bourdons en utilisant respectivement comme stimuli, des signaux visuels puis des ondes électromagnétiques.

Conditionnement visuel

Au cours de l'entraînement suivant, la zone de pré-entraînement ne fournissait plus de solution sucrée et la zone d'entraînement était ouverte pour permettre l'accès au labyrinthe en T. Pour nous assurer que les bourdons pouvaient être conditionnés dans le labyrinthe en T, nous avons réalisé un conditionnement différentiel visuel comme contrôle positif. Dans les labyrinthes standards en Y, les abeilles et les bourdons sont capables d'associer une récompense à une couleur (Avarguès-Weber et al. 2011). Pour réaliser ces tests, nous avons disposé, sur toute la longueur des branches précédemment éclairées par des ondes, des bandes de couleurs. Ces bandes recouvraient toute la hauteur des murs (h=5 cm), leurs longueurs (l=21 cm), et leurs extrémités. Elles étaient faites de papier Canson© découpé et plastifié de couleur verte et jaune (références : C31032S114, C31032S103) et glissé entre quatre encoches que nous avons rajoutées sur chaque branche du labyrinthe. Nous avons utilisé un protocole de conditionnement différentiel pour les bourdons que nous voulions conditionner aux couleurs. En effet, les bourdons devaient associer la présence de la couleur verte à une récompense d'eau sucrée (stimulus conditionnel positif, CS+) et la présence de la couleur jaune à de l'eau non récompensée (stimulus conditionnel négatif, CS-) (n=10), ou la configuration opposée (n=10), pendant 10 essais consécutifs (n=20). Nous avons réalisé l'ensemble des essais pour un même individu dans la même journée. Pendant toute la durée de ces expériences, les radars étaient éteints.

Conditionnement électromagnétique

Une fois le dispositif expérimental validé, nous avons utilisé un protocole de conditionnement absolu pour les bourdons que nous voulions conditionner aux ondes. En effet, les bourdons devaient associer la présence d'une onde électromagnétique à une récompense d'eau sucrée (stimulus conditionnel positif, CS+) et l'absence d'onde électromagnétique à de l'eau non récompensée (stimulus conditionnel négatif, CS-) (n=15), ou la configuration opposée (n=15), pendant 10 essais consécutifs (n=30).

Nous avons considéré un essai à partir du moment où le bourdon était entré dans la zone d'entraînement jusqu'à ce qu'il boive la solution récompensée et retourne à sa colonie. Nous avons fait l'hypothèse que si les bourdons pouvaient détecter et utiliser les ondes électromagnétiques comme des signaux informatifs, ils devaient choisir systématiquement le côté récompensé du labyrinthe en T.

Pour chaque type de conditionnement et à chaque essai, nous avons assigné de manière pseudo-aléatoire CS+ et CS- dans les bras du labyrinthe. Les bourdons étaient libres de venir dans le labyrinthe quand ils étaient motivés ce qui signifie que nous ne pouvions contrôler l'intervalle de temps entre chaque essai (ITI) (pour les ondes : n=270, moyenne ± erreur standard =, 9.483 ± 5.299 min, étendue : 3 - 47 min ; pour les couleurs : 7.25 ± 3.649 min, 4 – 26 min). Après chaque visite, nous avons nettoyé le labyrinthe avec de l'éthanol 70° et nous avons changé le *feeder* pour nous assurer qu'aucun résidu chimique ne puisse biaiser les choix des bourdons. Nous avons défini le premier choix comme étant le premier *feeder* que le bourdon a touché avec ses antennes ou avec son proboscis. S'il s'agissait du côté récompensé, l'essai était considéré comme réussi (sinon, c'était un échec).

Après l'entraînement, nous avons effectué un test sans récompense au cours duquel le bourdon testé devait choisir entre deux *feeders* vides afin de nous assurer qu'il n'y avait pas de biais induit par la présence de solution sucrée ou d'eau. Un choix correct pendant le test indiquait que le bourdon avait appris à associer le stimulus (onde ou couleur) à une récompense.

Analyses statistiques

Pour chaque type de stimulus utilisé (couleurs ou ondes), nous avons testé l'influence du nombre d'essais (1-10) et de l'intervalle de temps entre chaque essai (ITI, sous-tendant la motivation des individus) sur le premier choix des bourdons ($CS+_{succès}$=1, $CS+_{échec}$=0). Pour cela, nous avons utilisé un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM ; package lme4, Bates et al. 2015) avec une structure d'erreur binomiale et l'identité des individus en facteur aléatoire, suivi d'une ANOVA (package car, Fox and Weisberg 2019). Nous avons ensuite comparé le nombre de bourdons qui réussissait le test final (*feeders* vides) en utilisant le test du Chi2 avec une correction continue (fonction chisq.test de R).

Nous avons également testé l'effet de la modalité du conditionnement (couleurs : récompense associée au vert ou au jaune, ondes : récompense associée à la présence ou à l'absence d'ondes) sur la capacité des individus à réussir les essais en apprenant l'association stimulus – récompense. Pour cela, nous avons réalisé un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM ; package lme4, Bates et al. 2015) avec une structure d'erreur binomiale et l'identité des individus en facteur aléatoire, suivi d'une ANOVA (package car, Fox and Weisberg 2019).

L'ensemble des essais des bourdons dans le labyrinthe a été filmé avec une caméra (webcam Logitech HD 720p) (Figure 23) et nous avons extrait de ces films les trajectoires de chaque bourdon conditionné aux ondes et aux couleurs à l'aide d'un programme PYTHON développé au laboratoire (programmation Loïc Goulefert) afin d'analyser plus en détails leurs déplacements à chaque essai. A l'aide des vidéos, nous voulions évaluer la latence des bourdons au cours des essais pour rejoindre la récompense et si le choix d'un bourdon émergeait plus en amont de la branche secondaire (avant d'atteindre son extrémité et le *feeder*). Pour extraire les trajectoires des bourdons, nous avons binarisé les images (passage de l'image en noir et blanc) en délimitant un seuil permettant d'obtenir l'entièreté de l'image blanche, excepté le bourdon (noir). Ensuite, nous avons calculé le centre de ce point noir afin d'extraire la position du bourdon. Nous avons également calibré chaque vidéo en délimitant les aires du labyrinthe en T. Nous avons défini quatre zones, respectivement dans l'ordre de proximité du couloir principal : zone A (zone avant présence onde), zone B (zone détection onde), zone C (zone proche du *feeder*), *feeder* (zone dans laquelle se trouve le *feeder*, non visible à la vidéo) (Figure 23). Une fois ces zones définies, nous avons extrait le premier choix des bourdons dans chaque zone du labyrinthe.

Ensuite, pour chaque type de conditionnement, nous avons calculé la probabilité de choisir le côté où se trouvait la récompense en fonction de la position de la récompense (droite ou gauche) et cela, pour chaque zone des branches du labyrinthe. Nous avons calculé l'intervalle de confiance comme l'intervalle de score de Wilson (Wilson 1927), utilisé pour estimer les intervalles de confiance des proportions binomiales.

Pour comparer la vitesse d'apprentissage en fonction du type de stimuli utilisé, nous avons testé si le type de conditionnement (aux couleurs ou aux ondes) et le nombre d'essais influençaient la latence pour atteindre la zone *feeder* récompensée. Pour cela, nous avons réalisé un modèle linéaire mixte avec le nombre *d'essais* et le type de *stimuli* en facteur fixe et l'*individu* en facteur aléatoire, suivi d'une fonction Anova (package *lme4* et *car*). Pour les individus conditionnés aux ondes, nous n'avons pas réussi à extraire l'ensemble des vidéos en raison du mauvais positionnement des caméras au-dessus du dispositif ($n_{vidéos\ extraites}/n_{vidéos\ totales}$ = 199/300).

RÉSULTATS

Expérience 1 : Détection des frelons asiatiques par radar FMCW

Dans cette expérience, nous avons évalué si le radar FMCW développé pour suivre les trajectoires de bourdons en trois dimensions (Dore et al. 2020) était utilisable pour étudier les frelons. Les trajectoires obtenues (Figure 25) sont cohérentes avec le comportement observé des frelons et les données extraites de la littérature (Dore et al. 2020). Nos résultats montrent que nous avons réussi à obtenir des trajectoires de frelons asiatiques grâce au radar FMCW 77,5 GHz (Figure 25). Le frelon suivi quitte le *feeder* de crevettes et effectue un vol autour de ce dernier, faisant écho à un comportement de vol d'orientation qui permet aux insectes de mémoriser les informations visuelles d'un lieu (Zeil et al. 1996).

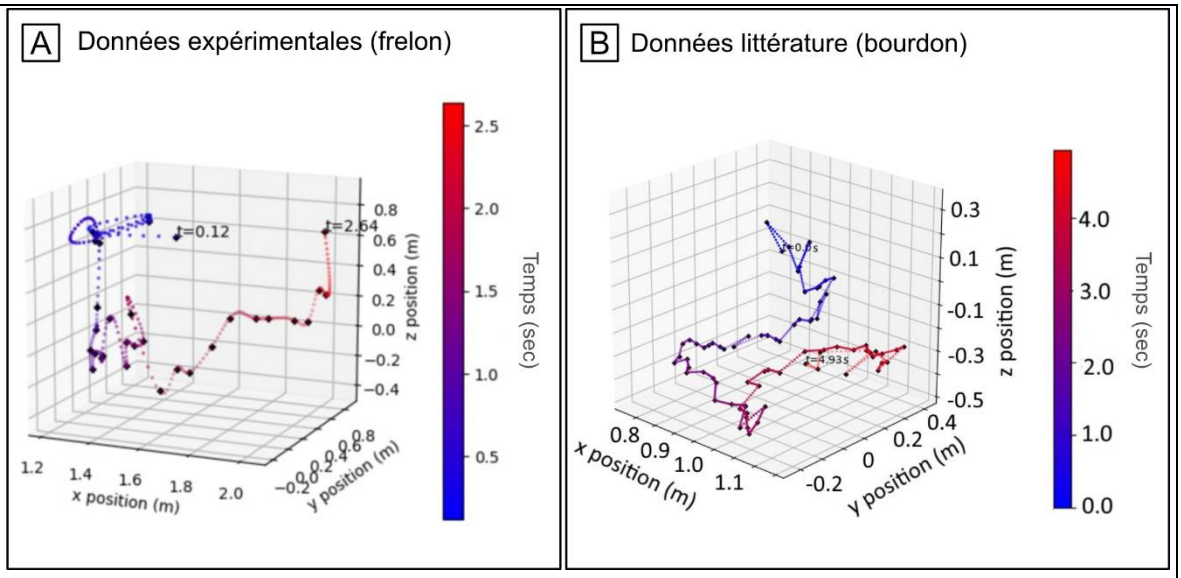


Figure 25
Trajectoires d'insectes en vol libre et en milieu naturel obtenu après l'analyse du signal enregistré par un radar FMCW (77,5 GHz). A) Données expérimentales sur frelon asiatique, source : Alexandre Dore et Dominique Henry, B) Données extraites de la littérature (Dore et al. 2020)

Expérience 2 : Détection des ondes électromagnétiques par les bourdons

Dans un premier temps, pour vérifier la validité de notre dispositif expérimental, nous avons testé la capacité bien documentée des bourdons à réaliser un apprentissage différentiel visuel dans le labyrinthe en T (Avarguès-Weber et al. 2011). Dans ces conditions, et comme attendu, les bourdons ont associé les couleurs à la présence ou à l'absence de récompense (Figure 26A). Le pourcentage de bourdons qui ont réussi un essai a augmenté avec le temps (GLMM, *essai* : X^2=18,509, df=9, p=0,030) et non avec la motivation des individus (GLMM *ITI* : X^2=2,066, df=1, p=0,151). Les bourdons ont choisi plus souvent le côté récompensé dans le test final (Test du Chi2, 19/20 bourdons qui ont choisi CS+, X^2=16,2, df=1, p=<0,001). Le pourcentage de bourdons qui ont réussi leurs essais était similaire entre les deux modalités de conditionnement aux couleurs (CS+ associé au vert ou au jaune) (GLMM, *couleur de l'association* : X^2=3,345, df=1, p=0,067).

Ces bourdons conditionnés aux couleurs avaient une probabilité égale de choisir la branche récompensée lorsque la récompense se trouvait dans la branche de gauche ou dans la branche de droite (Figure 27A). Ces résultats ont été observés pour chacune des zones du labyrinthe, excepté pour

la zone *feeder* dans laquelle les individus ont choisis plus souvent la branche récompensée en premier quand la récompense se trouvait à gauche (n=20, gauche : zone A : moyenne = 0,661, IC=0,564-0,746, zone B : moyenne=0,618, IC=0,521-0,707, zone C : moyenne=0,6, IC=0,502-0,690, zone *feeder* : moyenne=0,804, IC=0,716-0,870 ; droite : zone A : moyenne = 0,0585, IC=0,486-0,677, zone B : moyenne=0,569, IC=0,0470-0,662, zone C : moyenne=0,538, IC=0,441-0,633, zone *feeder* : moyenne=0,359, IC=0,271-0,457). Dans cette aire (*feeder*), nous avons remarqué des « trous » manquants dans les trajectoires des bourdons, liés certainement à la position des caméras. Ces « trous » semblent avoir causé une sous-estimation des transitions des bourdons dans cette aire. L'ensemble des résultats indiquent que les bourdons ont détecté les ondes et ont choisi les branches du labyrinthe sur la base de cette information.

Nous avons ensuite testé la capacité des bourdons d'associer la présence ou l'absence d'ondes électromagnétiques (60GHz) à une récompense d'eau sucrée. En se basant sur le premier choix (premier *feeder* que le bourdon a touché avec ses antennes ou avec son proboscis), les bourdons ne semblent pas avoir associé les ondes électromagnétiques à la récompense sucrée (Figure 26B). Durant le conditionnement, le pourcentage de bourdons qui ont réussi un essai n'a pas augmenté avec le temps (GLMM, *essai* : X^2=5,198, df=9, p=0,817). En revanche, ce pourcentage a augmenté avec la diminution de l'intervalle de temps entre chaque essai (GLMM, *ITI* : X^2=6,455, df=1, p=0,011). Par conséquent, plus les bourdons étaient motivés pour revenir dans le labyrinthe rapidement, plus ils réussissaient leurs essais. Lors du test final de mémoire (essai avec aucune récompense), les bourdons ont choisi la première branche du labyrinthe de manière aléatoire (Test du Chi2, 12/20 bourdons qui ont choisi CS+, X^2=0,8, df=1, p=0,371). Le pourcentage de bourdons qui ont réussi les essais était similaire entre les deux modalités de conditionnement aux ondes (CS+ associé ou dissocié de l'onde) (GLMM, *association/dissociation onde* : X^2=0,109, df=1, p=0,741).

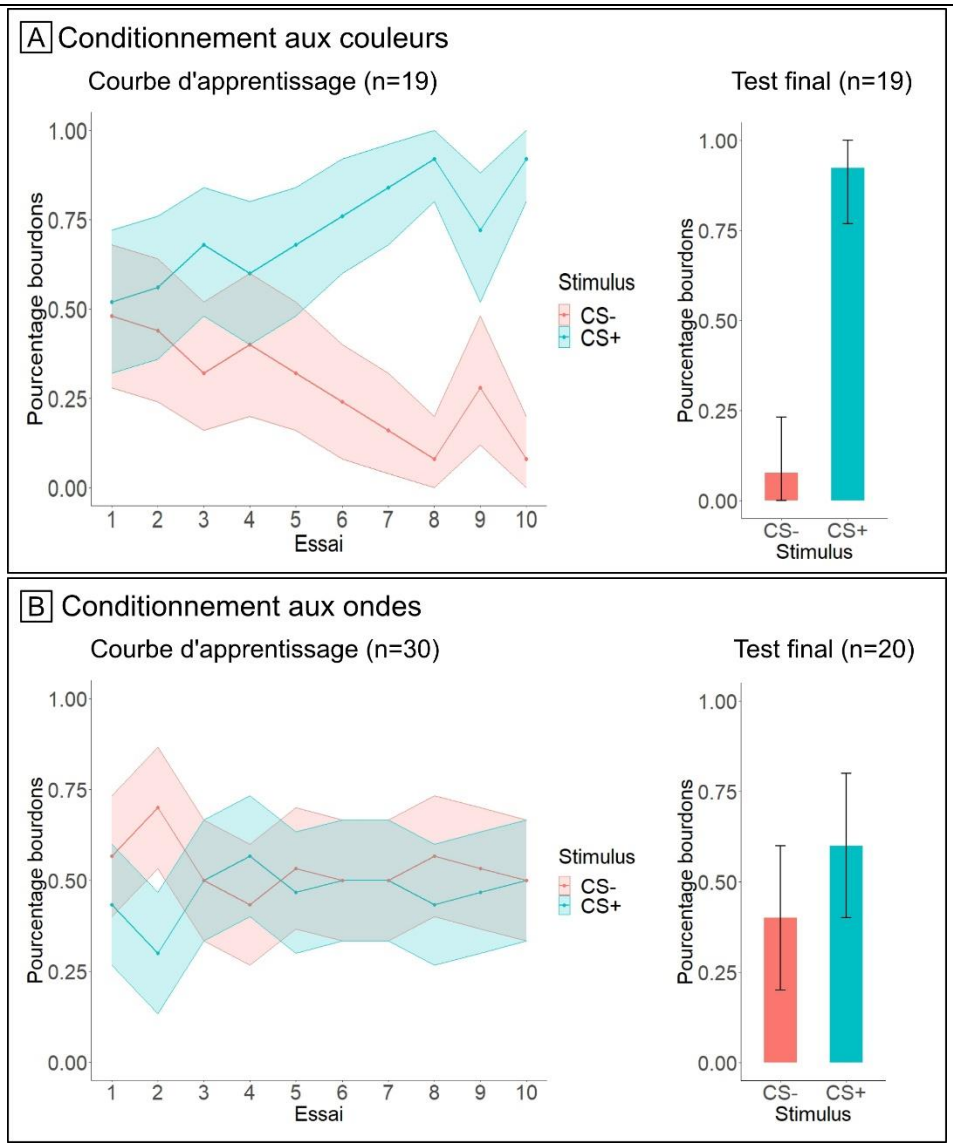


Figure 26
Courbes d'apprentissages et tests finaux pour le conditionnement, A) aux couleurs, B) aux ondes. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. N est le nombre de bourdons testés.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la présence d'une éventuelle préférence motrice de la part des bourdons. En effet, les bourdons avaient une plus grande probabilité de choisir la branche récompensée lorsque la récompense se trouvait à gauche (Figure 27B). La probabilité de choisir la branche récompensée en premier était significativement plus faible lorsqu'elle était du côté droit du labyrinthe (n=20, zone A : moyenne = 0,39, IC=0,315-0,470, zone B : moyenne=0,384, IC=0,309-0,464, zone C : moyenne=0,398, IC=0,323-0,478) et plus élevée lorsque la branche récompensée était à gauche (zone

A : moyenne=0,689, IC=0,612-0,757, zone B : moyenne=0,676, IC=0,599-0,746, zone C : moyenne=0,635, IC=0,556-0,707, *feeder* : moyenne=0,677, IC=0,599-0,746) (Figure 27B), excepté dans la zone *feeder* (*feeder* : moyenne=0,442, IC=0,365-0,523). Ces résultats suggèrent que les bourdons n'ont pas détecté les ondes électromagnétiques et ont choisi les branches du labyrinthe basé sur leur position spatiale.

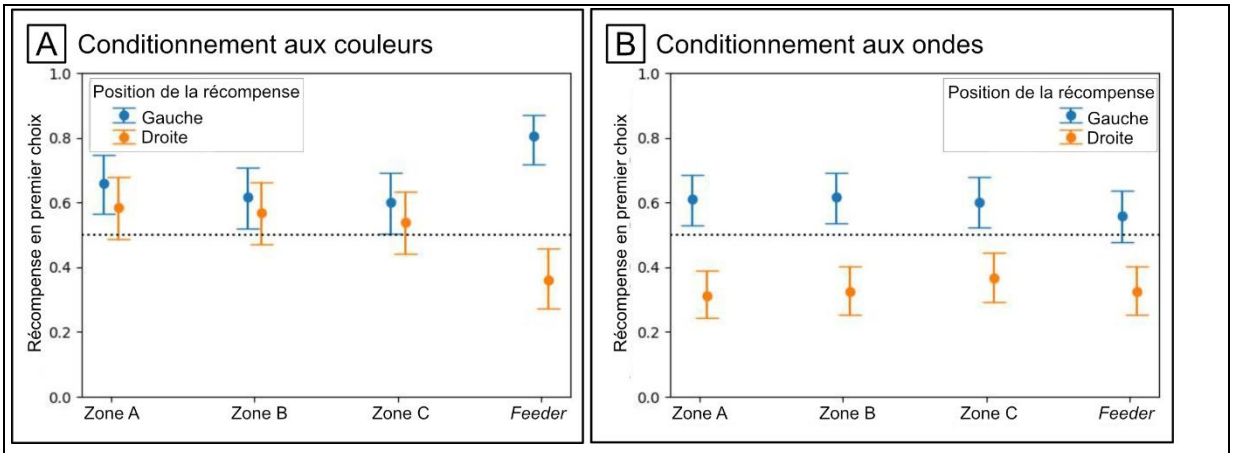


Figure 27
Probabilité de choisir le côté récompensant en premier en fonction des différentes zones du labyrinthe lorsque les bourdons sont conditionnés A) aux couleurs (n moyen : $n_{zone\ A,\ gauche}$ = 5,6, $n_{zone\ B,\ gauche}$ = 5,5, $n_{zone\ C,\ gauche}$ = 5,5, $n_{zone\ feeder,\ gauche}$ =4,6, $n_{zone\ A,\ droite}$ = 5,3 , $n_{zone\ B,\ droite}$ = 5,1 , $n_{zone\ C,\ droite}$ = 5,2, $n_{zone\ feeder,\ droite}$ = 3,9) et B) aux ondes (n moyen : $n_{zone\ A,\ gauche}$ = 10, $n_{zone\ B,\ gauche}$ = 9,9, $n_{zone\ C,\ gauche}$ = 9,8, $n_{zone\ feeder,\ gauche}$ = 9,5, $n_{zone\ A,\ droite}$ = 10,3, $n_{zone\ B,\ droite}$ = 10,2 , $n_{zone\ C,\ droite}$ = 10,4, $n_{zone\ feeder,\ droite}$ = 9,9). Points et barres d'erreurs : probabilité moyenne de choisir le côté récompensé en premier choix et intervalle de confiance à 95%.

DISCUSSION

Un nouveau système de suivi basé sur la technologie radar FMCW a été développé pour étudier les trajectoires de vol des insectes en milieu naturel (Dore et al. 2020; Dedic et al. 2023). Ce système est plus précis, moins onéreux et, plus mobile que les systèmes existants tels que les radars harmoniques (Woodgate et al. 2021). Il permet également de suivre plusieurs individus à la fois, sans l'utilisation de tags, et en trois dimensions (Dore et al. 2020). Il s'agit donc d'une approche très prometteuse pour de futures études comportementales sur les insectes volants, qu'ils soient bénéfiques (i.e. pollinisateurs) ou nuisibles (i.e. prédateurs), en conditions naturelles. L'objectif de notre étude était de démontrer l'application de ce système aux frelons asiatiques. Nous voulions également vérifier que les insectes ne sont pas sensibles aux ondes émises par les radars, ce qui pourrait fausser les futures expériences comportementales. Pour ce deuxième objectif, nous avons utilisé des bourdons car ces insectes peuvent être testés toute l'année et sont plus simples à manipuler en laboratoire que les frelons.

Les résultats de l'expérience 1 indiquent que les radars FMCW utilisés pour détecter les bourdons (Dore et al. 2020) peuvent détecter des frelons asiatiques en vol libre et sans *tags*. Il permet également de suivre des comportements d'intérêt, illustrés dans nos résultats par un vol s'apparentant à un vol d'orientation, permettant aux individus qui l'effectuent de mémoriser des informations visuelles d'un lieu pour y retourner (Zeil et al. 1996). Bien que les enregistrements de trajectoires que nous avons effectués sont sur des temps et des distances courtes (suivi de quelques secondes sur une distance d'1 mètre), le développement de ces radars est toujours en cours par les collègues du LAAS CNRS (Dedic et al. 2023) et pourrait permettre le suivi d'individus sur des distances bien plus grandes (plusieurs centaines de mètres) dans un futur proche, par exemple en changeant les fréquences et puissances d'émission (Dore et al. 2022). De ce fait, dans le cadre de la lutte contre les frelons asiatiques, nous pourrions imaginer placer ces radars sur des drones et suivre le déplacement d'individus en mouvement. Cela nous permettrait d'identifier les nids proches des ruchers et les détruire afin de réduire leur impact dans cette zone.

Les résultats de l'expérience 2 suggèrent que les bourdons ne détectent pas les ondes électromagnétiques émises par des radars à une fréquence de 60GHz puisqu'ils ne sont pas parvenus à associer la présence de ces ondes avec une récompense. A l'inverse, conformément à la littérature, ils réussissent à associer correctement une récompense quand les stimuli sont des couleurs (Avarguès-Weber et al. 2011), ce qui nous indique que le labyrinthe en T que nous utilisons est propice, *a minima*, à un certain type d'apprentissage par les bourdons.

Cependant des expériences complémentaires sont nécessaires pour conclure définitivement. En raison des contraintes imposées par le dispositif expérimental, les zones d'éclairage par les radars démarrent à l'entrée de chaque branche secondaire du labyrinthe et sont absentes de toute la branche principale. De ce fait, les bourdons doivent s'engager dans une des deux branches secondaires avant d'être illuminés par les ondes radar et recevoir ce stimulus, contrairement au conditionnement aux couleurs. En effet, dans notre étude, lorsque les stimuli étaient des couleurs, les bourdons pouvaient les détecter dès leur avancée dans la branche principale. Avec les couleurs, les bourdons pouvaient prendre la décision de s'engager dans une branche plus en amont de l'embranchement, ce qui a pu limiter leurs erreurs. Quand il s'agissait des ondes, ils devaient s'engager dans la branche pour recevoir le stimulus. Une fois engagés dans une branche, ils semblaient faire peu de demi-tours (bien que cette branche fût non-récompensée, observations personnelles) et allaient jusqu'à son extrémité, ce que nous avons comptabilisé comme un choix (qui peut s'avérer juste ou faux pour accéder à la récompense). En effet, nos résultats indiquent que dès leur entrée dans la branche secondaire et avant de recevoir le stimulus, ces derniers ont un biais de choix vers la branche du côté gauche. Ce biais n'est pas retrouvé pour les bourdons conditionnés aux couleurs. Ne pouvant détecter les ondes pour décider dans quelle branche s'engager, le fait de choisir plus souvent le côté gauche pourrait s'avérer être une autre stratégie afin d'accéder à la récompense. Une fois engagés dans une branche, les bourdons (bien que percevant les ondes ou leur absence) auraient pu décider d'avancer tout de même dans la branche malgré l'absence de récompense. Les bourdons conditionnés aux couleurs auraient pu décider plus tôt quelle branche choisir, réduisant ainsi leurs taux d'erreur dans le labyrinthe.

De plus, le dispositif expérimental que nous avons utilisé a pu induire un biais dans le conditionnement des bourdons aux ondes. Puisque nous avons testé un seul type d'onde électromagnétique (à 60GHz), nous avons utilisé le principe du conditionnement absolu : l'onde était présente d'un côté et absente de l'autre. Avec les couleurs en tant que stimuli, nous avons utilisé le principe du conditionnement différentiel : couleur A d'un côté et couleur B de l'autre. Les abeilles discriminent mieux les couleurs proches dans le cas d'un conditionnement différentiel que d'un conditionnement absolu (Dyer and Chittka 2004). Nous pouvons alors supposer que les ondes radar utilisées soient difficiles à discriminer pour les bourdons : dans l'éventualité où les bourdons seraient capables de détecter ces ondes, un conditionnement différentiel avec deux ondes différentes faciliterait leur choix. Le fait que les bourdons ont été conditionnés en absolu aurait pu en effet limiter leurs apprentissages. Pour pallier cela, nous envisageons d'utiliser deux types de radars émettant deux ondes différentes (par leurs fréquences ou leurs puissances) : que l'une soit récompensée et non l'autre.

Si nos résultats préliminaires nous permettent de valider l'utilisation des radars FMCW à ondes millimétriques pour le suivi des frelons asiatiques, ils ne nous permettent donc pas de conclure sur une absence totale de détection des ondes millimétriques par les bourdons. En effet, il est possible que les bourdons puissent détecter d'autres types d'ondes (d'autres fréquences ou puissances). Pour explorer cette possibilité, nous prévoyons de mener des expériences supplémentaires, par exemple en doublant la puissance d'émission (13dBm, échelle logarithmique). Nous souhaiterions également tester l'utilisation de micro-ondes pulsées pour tenter de contrôler la bande de fréquence perçue par les bourdons (Greggers et al. 2013). Enfin, ces mêmes expériences devront être réalisées sur les frelons pour validation finale. En plus de nous assurer que l'utilisation de ces radars n'impacte pas le comportement des insectes que nous souhaiterions suivre, nos résultats pourraient également avoir un champ d'application plus large : ils nous donneraient des indications quant à la détection d'ondes appartenant aux bandes de fréquences utilisées en téléphonie. Si les insectes peuvent détecter ce type d'ondes, nous pourrions nous attendre à ce qu'elles entraînent des perturbations comportementales sur les populations de pollinisateurs en déclin, comme les bourdons (Goulson et al. 2015). A l'inverse, ces ondes

pourraient être utilisées pour lutter contre des espèces nuisibles, par exemple pour éloigner les frelons des ruchers.

CHAPITRE 4 : EXPLORATION ET DÉVELOPPEMENT D'UNE SOLUTION DE BIOCONTROLE

RÉSUMÉ

Les méthodes utilisées actuellement dans le cadre de la lutte contre le frelon asiatique sont peu efficaces, chronophages ou dangereuses pour la biodiversité. Pour limiter l'utilisation d'insecticides pour détruire les nids de frelons, nous avons testé l'efficacité d'une méthode de lutte biologique faisant l'utilisation d'un entomopathogène, *Metarhizium robertsii.* Nous avons d'abord évalué son effet sur la survie de trois hyménoptères cibles et non cibles. Pour cela, nous avons exposé ces espèces à différentes concentrations de spores de *M. robertsii* et nous avons suivi leur mortalité pendant 8 jours. Nous avons mis en évidence que ce champignon affecte la survie des frelons et que ces derniers sont plus susceptibles aux fortes concentrations de spores que les espèces non cibles. Ensuite, nous avons évalué l'effet de ce champignon sur les capacités de locomotion du frelon asiatique puisque c'est en se déplaçant qu'il peut, à la fois, transmettre le pathogène à ses congénères mais également contaminer des espèces non cibles. Pour cela, nous avons exposé des frelons aux spores de *M. robertsii* et nous avons analysé leur activité individuelle 24h, 48h et 72h post-exposition. Nous n'avons identifié aucune diminution des capacités de locomotion du frelon asiatique lorsque ce dernier est infecté à *M. robertsii.* Cependant, nous avons démontré une augmentation des comportements de toilettage qui soulignent la capacité des frelons à détecter ce pathogène et potentiellement, à réduire son effet. Enfin, en cas de contaminations indésirables, nous avons souhaité savoir si une espèce pollinisatrice, le bourdon, était capable de développer des mécanismes de défense alimentaire contre *M. robertsii*. Pour cela, nous leur avons proposé différents régimes alimentaires et nous avons mesuré leur consommation. Les individus infectés à *Metarhizium* ne parviennent pas à adapter leur régime alimentaire en fonction de l'infection reçue et à sélectionner un régime qui améliore leur survie. L'ensemble de nos expériences ont mis en évidence un effet concentration important dans l'impact du pathogène sur le frelon mais également sur les espèces non cibles. Pour conclure à l'efficacité de la méthode de biocontrôle que nous proposons, des expériences complémentaires sont nécessaires, d'une part pour connaître la transmission du pathogène dans une colonie de frelons et la concentration nécessaire à injecter dans les nids, d'autre part, pour évaluer le réel risque de contaminations indésirables en milieu naturel d'une espèce non cible.

CHAPITRE 4 : EXPLORATION ET DÉVELOPPEMENT D'UNE SOLUTION DE BIOCONTROLE

CONTRIBUTION

Lacombrade Mathilde[1234], Blandine Mahot-Castaing[1], Naïs Rocher[1], Stephane Kraus[1], Tamara Gomez-Moracho[1], Cristian Pasquaretta[1], Mael Rannou[1], Laurène LeBreton[1], Zoé Tourrain[2], Denis Thiéry[2], Fanny Vogelweith [3], Mathieu Lihoreau[1]

[1] Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Integrative (CBI) ; Université Paul Sabatier – Toulouse III, France

[2] UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRAe, F-33883 Villenave d'Ornon, France

[3] M2i Biocontrol, 370 route de Cauzenil, Parnac, France

[4] Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Université de Toulouse, CNRS, France

MLa, FV, DT, MLi, TG-M, SK ont mis en place le design expérimental des expériences de ce chapitre. MLa, BMC, NR, MR, LLB ont collecté les données. MLa a analysé les données avec l'aide de SK et CP.

INTRODUCTION

Depuis le XX^{ème} siècle et le début de l'agriculture industrielle, la multiplication des pratiques de monocultures intensives ainsi que la densification des plants cultivés réduisent la biodiversité locale (Liebman 1996) et favorisent le développement des nuisibles (Pimentel and Perkins 2019). Ajouté à ce phénomène, l'accélération de la mondialisation accentue l'apparition d'espèces invasives et nuisibles (Meyerson and Mooney 2007). Ici, le terme « nuisibles » fait référence à l'ensemble des organismes qui entraînent des dégâts sur les plantes cultivées ou animaux domestiques. Avec le temps, ces nuisibles sont devenus plus abondants et spécialistes (Culliney 2014). Dans le monde, ces derniers seraient responsables de 35 à 42% de la perte de production des cultures dont 14% serait attribuée aux insectes, 13% aux pathogènes et 13% aux plantes adventices (Pimentel 2009). Pour leur quantité et leur prédictibilité, les insectes nuisibles utilisent les espèces animales ou végétales pour se nourrir, se reproduire et nicher (Culliney 2014; Yin et al. 2019). Afin de préserver et diminuer l'impact de ces insectes nuisibles sur la production, l'utilisation d'insecticides n'a cessé d'augmenter depuis l'essor de la chimie organique de synthèse dans les années 1940 (Zhang 2018; Tudi et al. 2021). En réponse à l'utilisation massive de ces insecticides et à leur impact délétère sur la biodiversité (Goulson et al. 2015; Gill et al. 2016), le biocontrôle est devenu un champ de recherche en pleine expansion dans les années 1980.

En France, les produits de biocontrôle sont définis par le Code Rural et de la Pêche Maritime (Article L.253-6) comme étant « *des agents et produits utilisant des mécanismes naturels dans le cadre de la lutte intégrée contre les ennemis des cultures. ».* On compte 4 familles de produits de biocontrôle disponibles : (1) les macro-organismes (type nématodes, acariens), (2) les microorganismes (type bactéries, virus, champignons), (3) les médiateurs chimiques (type phéromones, kairomones) et (4) les substances naturelles (d'origine animale, végétale, minérale). L'utilisation des produits de biocontrôle ne cesse de s'accroître puisqu'ils sont plus sélectifs et d'une toxicité moindre pour les espèces bénéfiques non cibles comparés aux insecticides (Lacey et al. 2015). En France, d'après IBMA France (association française des entreprises de produits de biocontrôle), le volume des ventes en 2021 des produits de biocontrôle (274 millions d'euros) est en hausse de 16% par rapport à 2020. On note aussi que

les quantités totales de substances actives vendues de produits utilisables en agriculture biologique et de biocontrôle, publiée par les ministères chargés de l'agriculture et de l'environnement sont en augmentation : la moyenne triennale 2018-2020 est en progression de 20% par rapport à la moyenne triennale 2015-2017. Le biocontrôle inclut la lutte biologique, qui elle, concerne les méthodes qui utilisent exclusivement des agents vivants (macro- et microorganismes).

Depuis 2008 en France, les politiques publiques présentent un cadre favorable au développement du biocontrôle comme en témoignent le Grenelle de l'environnement (2008), les plans Ecophyto I (2008) et II (2015) et différents rapports de parlementaires (Antoine 2011; Dominique 2014). La réglementation sur le biocontrôle se précise grâce à la loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt (2014) qui introduit la définition des produits de biocontrôle dans le Code Rural et de la Pêche Maritime (énoncé précédemment). L'arrêté de février 2015 établit une liste des macro-organismes non-indigènes (https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000030511750) et la note de service de la DGAL (Direction Générale de l'Alimentation) qui établit la liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle (https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2018-54). En France, tout utilisateur d'un produit de biocontrôle professionnel doit obtenir la Certification Ecophyto. Bien que définie en France, il n'existe toujours pas de définition européenne du biocontrôle en 2023. Cependant, la notion de « protection biologique » a été introduite et définie dans la publication du 22 juin 2022 d'un projet de règlement du Parlement et du Conseil concernant l'utilisation des produits phytopharmaceutiques compatible avec le développement durable.

Historiquement, la lutte biologique contre les insectes ravageurs, soit l'utilisation de leurs ennemis naturels, est utilisée depuis des centaines d'années. La première référence date d'environ 900 à 1200 après J-C en Chine, où des nids de la fourmi prédatrice *Oecophylla smaragfina* étaient placés dans les arbres à agrumes pour lutter contre les insectes se nourrissant du feuillage de ces arbres (Shields et al. 2019). Un des succès historiques célèbre du biocontrôle est le cas de la lutte contre la cochenille

(*Icerya purchasi)* en Californie. La cochenille, d'origine australienne, avait été accidentellement introduite aux Etats-Unis en 1868 et depuis, était responsable de ravages conséquents sur les arbres à agrumes. Pour lutter contre la cochenille, la coccinelle vedalia (*Rodolia cardinalis*), un prédateur naturel de la cochenille en Australie, a été introduit en Californie. Cette méthode de lutte a conduit au contrôle quasi-complet de la cochenille en Californie dès 1889 (DeBach et al. 1971). Un autre grand succès du biocontrôle est le cas de l'utilisation de parasitoïdes oophages du genre Trichogrammes pour lutter contre les lépidoptères s'attaquant aux cultures de cannes à sucre et de maïs. Les premières études testant l'utilisation des trichogrammes datent des années 1930 en Chine (Zang et al. 2021). De nos jours, les trichogrammes sont commercialisés pour lutter contre les lépidoptères telles que la pyrale du maïs ou la mineuse de la tomate.

L'utilisation de la lutte biologique est une solution délicate dans la mesure où elle intervient directement sur les interactions entre les espèces. Ainsi, certaines espèces introduites volontairement sont devenues invasives et dangereuses pour la biodiversité locale. C'est le cas de l'introduction du crapaud buffle (*Bufo marinus*) en Australie en 1935 pour lutter contre des coléoptères (*Dermolepida albohirtum, Lepidiota frenchi*) qui ravageaient des champs de cannes à sucre dans le Queensland. Le crapaud s'est révélé être une espèce hautement invasive (on le retrouve à présent dans une grande partie du Nord-Est de l'Australie) et menaçant pour la biodiversité locale du fait de sa toxicité (Shanmuganathan et al. 2010). Les guppies (*Poecilia reticulata*) ont été introduits à travers le monde pour contrôler la malaria puisqu'ils se nourrissent des œufs des moustiques. A présent, ils se sont établis dans plus de 60 pays (Deacon et al. 2011) et au Mexique, ils sont reconnus comme dangereux pour les espèces de poissons indigènes (Valero et al. 2008). En France, la coccinelle asiatique (*Harmonia axyridis*) a été introduite dans les années 1980 pour protéger les cultures des pucerons. A partir de 2003, ces coccinelles asiatiques sont devenues invasives et menacent certaines cultures telles que la vigne (elles peuvent altérer le goût du vin car elles s'introduisent dans le processus de vinification) (Koch 2003) ainsi que les espèces de coccinelles locales puisqu'elles se nourrissent de leurs œufs (Roy et al. 2012). Les cas précédemment décrits soulignent l'importance d'évaluer en détails tous les paramètres

de l'utilisation, à court et long terme, d'une nouvelle méthode de lutte biologique pour limiter ses effets indésirables.

Lors d'une invasion biologique récente, telle que celle des frelons asiatiques en Europe, les ennemis naturels de cette espèce n'ont pas été introduits simultanément. Les potentiels prédateurs ou ennemis naturels de cette espèce prennent un certain temps avant de s'adapter à la nouvelle ressource qu'ils représentent. Dans le cadre de la recherche d'une solution de biocontrôle contre le frelon asiatique, des pistes d'ennemis naturels ou d'autres ont été évoquées. La première piste, en 2015, fait référence à l'utilisation d'une mouche de la famille des Conopidae (*Conops vesicularis)* dont les larves se développent comme parasitoïdes internes de guêpes et de bourdons adultes. Ces larves ont été retrouvées naturellement présentes dans l'abdomen de deux reines de frelons asiatiques. La seconde, en 2015 également, est un nématode (*Pheromermis vesparum*) que l'on retrouve dans l'eau et les sols saturés. Les œufs du nématode éclosent dans l'intestin d'insectes aquatiques et semi-aquatiques et leurs larves pénètrent la paroi intestinale pour entrer dans un état quiescent dans les tissus de l'hôte intermédiaire. Des larves de frelon asiatique ont été retrouvées naturellement parasitées par ce nématode et on suppose que ce parasitisme a été permis par leur alimentation avec des proies qui sont les hôtes intermédiaires de ces nématodes (Villemant et al. 2015). Une fois la larve parasitée, le nématode va se nourrir des tissus de la guêpe. La dernière, en 2018, démontre que deux entomopathogènes, *Metarhizium robertsii* et *Beauveria bassiana* (dont une fondatrice de frelon a été retrouvé naturellement parasitée), peuvent impacter négativement la survie de frelons asiatiques et ce, par différentes méthodes d'exposition (Poidatz et al. 2018b). Ces résultats soulignent le potentiel prometteur de ces parasites dans la lutte biologique contre les populations de frelon asiatique. En effet, ces deux parasites sont communément utilisés en lutte biologique (Lacey et al. 2015). *Beauveria bassiana* étant déjà breveté et ayant un spectre d'hôte plus large (Zimmermann 2007), je me suis concentrée dans toute la suite du chapitre sur l'utilisation de *M. robertsii* pour le développement d'une solution commerciale dans le cadre de la lutte contre le frelon.

Nous avons également sélectionné les champignons plutôt que d'autres parasites pour le développement d'une solution commerciale car les champignons sont naturellement présents dans les sols (cultivés ou non), qu'ils sont les eucaryotes les plus souvent associés naturellement aux insectes (Douglas 2015) et parce qu'ils peuvent infecter un organisme par simple ingestion ou contact et à tous les stades (œufs, larves, adultes) (Tallamy et al. 1998). Ils ont également un rôle bénéfique pour les plantes car certains sont endophytes (font partie du microbiote des plantes), antagonistes aux maladies ou promoteurs de développement (Elliot et al. 2000; Vega et al. 2009; Behie et al. 2012).

Comme tout agent biologique, l'efficacité dépend des facteurs climatiques et environnementaux. Des facteurs abiotiques limitent leur utilisation tels que le soleil (rayonnement UV) (Acheampong et al. 2020), l'humidité (nécessaire au développement mais peut aussi nettoyer les feuilles exposées au traitement) (Inglis et al. 2000), la température (sensibles aux fortes oscillations) (Inglis et al. 1999). Pour les utiliser correctement, il est indispensable de prendre en compte l'écologie spécifique de chaque champignon (Zimmerman 2007) et recommander d'utiliser des souches locales puisqu'elles sont déjà adaptées naturellement aux contraintes climatiques de la zone (Vega et al. 2009).

Metarhizium robertsii fait partie de l'ordre des hypocréales et du complexe d'espèce de *M. anisopliae.* Ce clade est nommé de manière informelle PARB et contient les champignons suivants : *M. pingshaense, M. anisopliae, M. robertsii* et *M. brunneum* (Figure 28). Ce sont les quatre espèces les plus fréquemment isolées des insectes et du sol (Rehner 2019). *M. anisopliae sensu stricto* est déjà commercialisé contre des acariens, des coléoptères, des diptères et des hémiptères (Lacey et al. 2015). On le retrouve communément dans plusieurs types de sols cultivés et non-perturbés des régions tempérées (Meyling and Eilenberg 2007). Il peut être produit en masse, formulé et appliqué de manière répété en spray, en granules ou en poudres (Lacey et al. 2015). C'est un champignon microscopique, endophyte et entomopathogène.

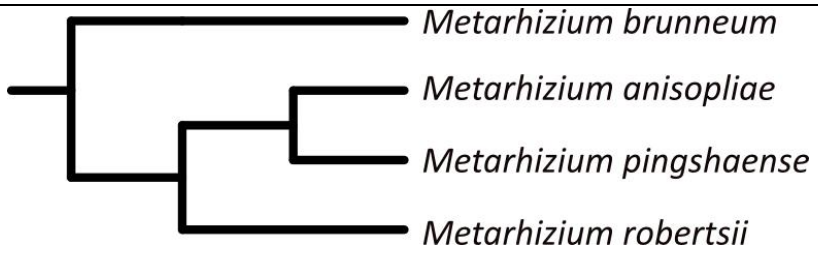


Figure 28
Arbre phylogénétique du complexe d'espèces de *Metarhizium anisopliae* (d'après Rehner and Kepler 2017).

Dans la suite de ce chapitre, je me focaliserai sur le potentiel entomopathogène du champignon *M. robertsii* qui a plus de 200 espèces d'hôtes (Zimmermann 2007). Pour se développer, le champignon doit coloniser le corps de son hôte. Chaque étape de son cycle de développement (Zimmermann 2007; Lacey et al. 2015) est détaillée ci-dessous (d'après Hajek and St. Leger 1994; Schrank and Vainstein 2010; Aw and Hue 2017, illustrée en Figure 29) :

- **L'adhésion :** Les conidies (spores asexuées) adhérent à la cuticule de leur futur hôte par des forces hydrophobiques, électrostatiques et des interactions protéiques.
- **La germination :** La germination est initiée par la présence de sources de carbone exogènes et d'azote. On peut dès cette étape, repérer la présence de tréhalase, une enzyme classiquement trouvée dans l'hémolymphe de l'hôte et nécessaire à la production d'énergie puisqu'elle convertit le glucose en tréhalose.
- **Formation de l'appressorium :** Les spores produisent des tubes de germes qui se différencient en appressorium, structure favorisant la pénétration dans les cellules hôte.
- **Colonisation de l'hémolymphe :** Une fois dans le corps de l'hôte, *Metarhizium* produit des destruxines (toxines) qui ont une action insecticide et qui répriment la réponse cellulaire et humorale de l'hôte. Parallèlement, le champignon produit des tréhalases pour convertir les tréhaloses en glucose, nécessaire à la production d'énergie pour sa propre croissance. Les hyphes se différencient en blastopores et sont distribuées passivement dans l'hémolymphe ce

qui permet au champignon de pénétrer d'autres tissus par développement végétatif dans tous les organes de l'insecte. Cette étape se termine par la mort de l'insecte hôte.

- **Extrusion et sporulation :** Après la mort de l'hôte et pendant l'étape de sporulation, les hyphes s'extrudent de la cuticule de l'hôte vers l'environnement extérieur et forment un réseau dense de spores vert olive à la surface du cadavre de l'hôte.

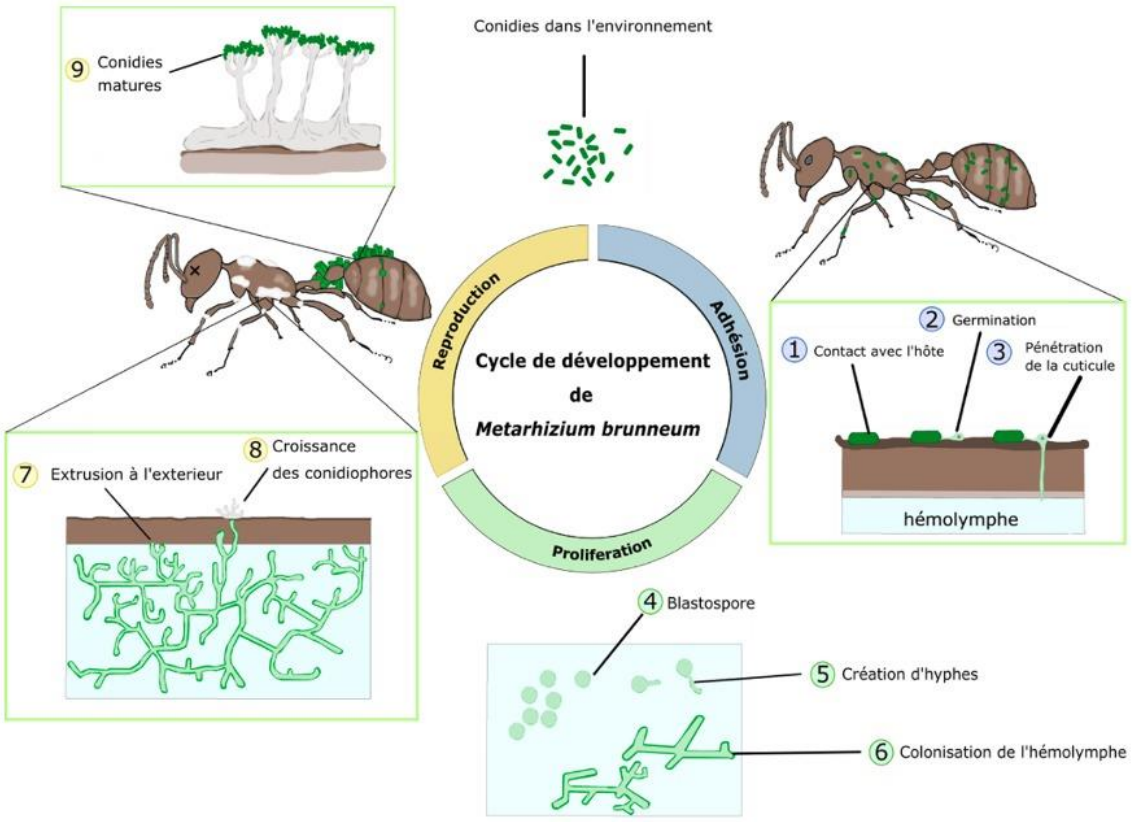


Figure 29
Cycle de vie de *Metarhizium brunneum sur son hôte (ici, une fourmi). Metarhizium robertsii* possède le même cycle de développement. Source et autorisation d'utilisation : Hugo Perreira.

Dans ce chapitre, mon objectif était d'identifier l'efficacité de *M. robertsii* comme méthode de biocontrôle du frelon asiatique et sa sûreté environnementale. Pour cela, j'ai comparé les effets létaux de *M. robertsii* sur le frelon asiatique et différentes espèces non cibles (guêpes communes, bourdons) ainsi que les effets sublétaux du champignon dans les jours précédents la mort des frelons asiatiques. Enfin, dans le cadre d'une potentielle contamination indésirable d'une espèce non cible, je me suis intéressée à la manière dont cette espèce pourrait lutter et mettre en place des systèmes de défense contre ce pathogène.

L'ensemble des méthodologies communes aux expériences de ce chapitre ont été réunies dans cette section. J'ai ensuite décrit les particularités de chacune d'entre elles dans les sous-chapitres correspondants.

1. Entomopathogène

A. Souche utilisée

La souche EF3.5(1) que nous avons utilisée de *Metarhizium spp.* (Figure 30) est *M. robertsii* et elle a été échantillonnée par un piège à insecte dans le sol des vignes de l'INRAe de Bordeaux (Poidatz et al. 2018b). Le champignon a été depuis mis en culture sur un milieu d'avoine et de chloramphénicol fixé à 50mg/ml (milieu OAC : farine d'avoine 40g, Potatoes Dextrose Agar 20g (Sigma Aldrich), chloramphénicol (Sigma Aldrich), eau permutée) et repiqué tous les 2 mois environ. Les boites de Petri le contenant ont été conservées à l'obscurité et dans une étuve à 26°C, température favorisant sa croissance (Kryukov et al. 2017). La souche a été génotypée et est déposée au CIRM-CF, INRAe de Marseille (Poidatz 2017).

B. Mode d'infection

Pour l'ensemble des expositions à *M. robertsii* dont il est question dans ce chapitre, j'ai préféré l'exposition par immersion dans une solution car c'est le mode d'infection le plus efficace contre le frelon et le moins chronophage (Poidatz et al. 2018b). Les solutions de spores ont été obtenues en mélangeant des spores, de l'eau distillée et du Tween80 (0.02%) afin de permettre une bonne homogénéité de la solution. Nous avons fixé les concentrations de spores dans les solutions en comptant leur nombre dans une cellule de Neubauer. La solution appelée « contrôle » (C) correspondait à un mélange d'eau distillée, de Tween80 (0.02%), sans spores. Une solution appelée à « faible concentration » (MR3) correspondait à une solution de spores fixées à 10^3 sp/ml et elle était appelé à « forte concentration » (MR7) lorsqu'elle était fixée à 10^7 sp/ml. Pour exposer les individus à un traitement de

spores ou contrôle, nous avons anesthésié les individus en les maintenant pendant une vingtaine de minutes au froid (4°C) et les avons plongé pendant 1 sec dans la solution.

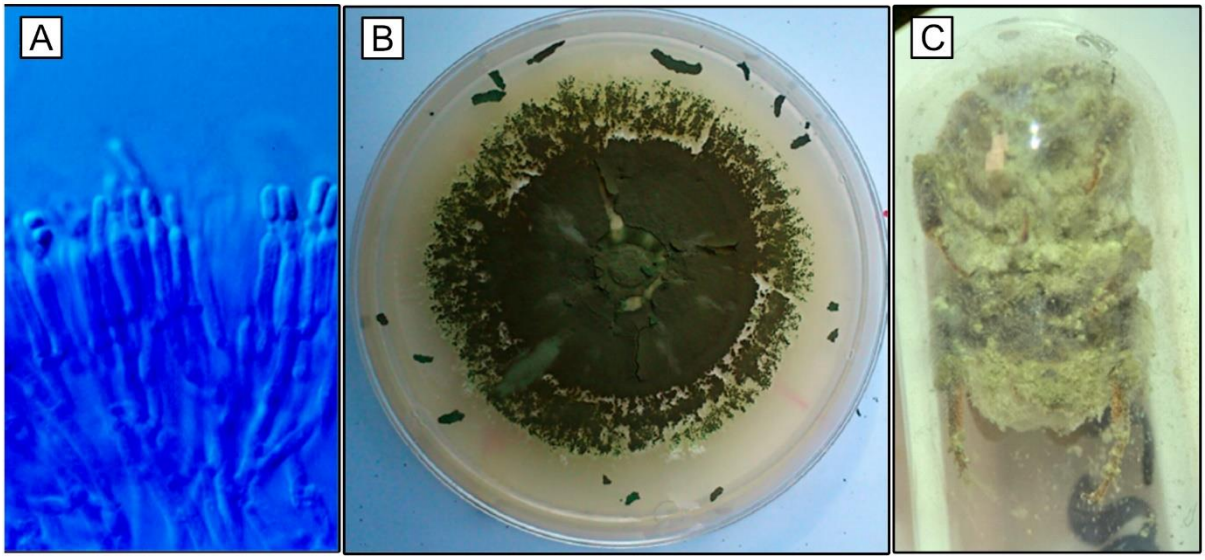


Figure 30
Metarhizium spp., A) Conidies et B) colonie mature (9 jours) de *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4) sur de l'agar de dextrose de pomme de terre à 28°C (Brunner-Mendoza et al. 2019). C) Sporulation de *Metarhizium robertsii* sur un cadavre de bourdons (*Bombus terrestris*) conservé dans une étuve à 26°C pendant 5 jours.

Afin de confirmer l'infection à *M. robertisi* des différents insectes exposés, et de ce fait son implication dans des symptômes observables ou la mort des individus, nous avons déterminé la présence ou absence des spores a posteriori par PCR (Polymerase Chain Reaction). A la fin de chaque expérience, nous avons sacrifié les individus en les congelant (-18°C). Ensuite, nous avons prélevé les abdomens de chaque insecte pour réaliser l'extraction d'ADN car dans le cycle de développement du champignon, les corps gras présents dans l'abdomen sont les premiers colonisés (Brunner-Mendoza et al. 2019).

Nous avons d'abord lysé les tissus de l'abdomen avant de réaliser l'extraction d'ADN. Du fait de l'épaisse cuticule des frelons et dans le souci d'avoir la même méthodologie pour chacune des espèces testées, nous avons décidé d'utiliser une méthode de lyophilisation avant broyage. Pour cela, nous avons isolé l'abdomen de chaque individu dans des microtubes de centrifugation (1,5ml), ajouté

2 billes (Ø1 mm) et refermé le tube avec de l'aluminium. Nous avons réalisé la lyophilisation puis broyé les abdomens 2 fois 30 secondes au *tissuelyser.*

L'ADN a ensuite été extrait avec le kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Pour la PCR, nous avons utilisé les primers (F-ATTACCAAGTCCAAAATACTGG et R- CATATACCCACCAACTACCC, Sigma Aldrich) (Mayerhofer et al. 2019) afin d'identifier spécifiquement *M. robertsii* des autres espèces de *Metarhizium* du complexe PARB. La validation et l'adaptation du protocole dans sa totalité ont été réalisées au laboratoire du CRCA (Toulouse) et de l'INRAe (Bordeaux). Pour la totalité des échantillons, l'extraction d'ADN a été réalisée à l'INRAe de Bordeaux et la PCR ainsi que la révélation ont été effectuées en sous-traitance par la plateforme de génotypage de l'Inserm U1215, Institut François Magendie. Nous ne pourrons présenter le résultat des analyses génétiques dans ce manuscrit puisqu'elles sont en cours d'obtention.

2. Insectes étudiés

A. Frelons et guêpes communes

Elevage

Dans l'ensemble des expériences de ce chapitre, nous avons utilisé le frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) puisqu'il est la cible de la méthode de biocontrôle que nous souhaitons tester. De plus, nous avons également porté notre attention sur l'effet de cette méthode sur une espèce non cible sauvage, la guêpe commune (*Vespula* vulgaris). Les nids de frelons asiatiques et de guêpes communes ont été prélevés dans la nature. Dans chacune des expériences, nous avons laissé le nid pendant 24 à 48h (en fonction de la taille du nid) dans une chambre froide directement après sa collecte. Une fois les insectes anesthésiés au froid, nous avons ouvert les nids pour récupérer les adultes et réaliser nos expériences. Pendant toute la durée des expériences, les insectes ont été maintenus dans le noir, à 26°C et 60% d'humidité relative. Nous avons séparé spatialement les individus contrôle des individus

exposés au champignon (une étuve distincte pour chaque groupe) afin de prévenir toute infection non désirable.

B. Bourdons

Utilisation

Dans l'ensemble des expériences de ce chapitre, nous avons également utilisé le bourdon comme modèle d'étude en tant qu'espèce non cible de notre solution de biocontrôle. En effet, c'est un modèle d'étude standard dans le cadre de travaux sur la relation hôte-parasite, et des mécanismes de défense individuelle et collective chez les insectes sociaux (Schmid-Hempel 2001). Son utilisation présente de nombreux avantages : il est robuste aux conditions de laboratoire, donne accès à des individus de différents stades de développement (larves, adultes) et les individus sont très proches génétiquement (favorise la transmission d'un pathogène) (Baer and Schmid-Hempel 2003). Contrairement aux abeilles domestiques, les bourdons peuvent être testés toute l'année grâce à la commercialisation des colonies et leur maintien en laboratoire.

Elevage

Les bourdons (*Bombus terrestris*) que nous avons utilisé proviennent de l'entreprise Koppert (Pays-Bas). Nous avons remplacé l'eau sucrée commerciale de composition inconnue par de l'eau sucrée à 30% (v/v) afin de nous assurer qu'aucun traitement antifongique n'était contenu dans leur nourriture, qui aurait pu biaiser nos expériences. Dans chacune des expériences, nous avons prélevé les bourdons de leur colonie d'origine et nous les avons anesthésiés dans de la glace pendant une vingtaine de minutes. Ensuite, nous les avons exposés à *Metarhizium* puis nous les avons isolés ou regroupés en microcolonies. Pendant toute la durée des expériences, les bourdons ont été maintenus dans le noir et dans une étuve à 26°C et 60% d'humidité relative. Nous avons séparé spatialement les individus contrôle des individus exposés au champignon afin de prévenir toute infection non désirable (dans deux étuves différentes).

Pour estimer la taille des individus, nous avons sacrifié les insectes en fin d'expérience en les plaçant dans un congélateur pendant plusieurs heures et nous avons mesuré la distance entre les deux ailes, qui est une bonne approximation de la taille des individus (Peat and Goulson 2005; Peat et al. 2005) . Nous avons mesuré cette distance en utilisant un logiciel Toupview couplé à un microscope Nikon SMZ 745T (x40) et une caméra U3CMOS. La distribution des tailles des individus étant homogène pour chacun des traitements que nous avons utilisés, nous nous sommes affranchis de ce paramètre dans la suite du manuscrit.

Analyses statistiques

J'ai réalisé l'analyse de données avec R (version 4.0.4) et le logiciel RStudio.

SOUS-CHAPITRE 4.1 : SENSIBILITÉ AUX SPORES DES ESPECES CIBLES ET NON CIBLES

Pour des raisons pratiques, les guêpes communes du genre *Vespula* seront désignées comme *guêpe* dans l'ensemble de ce sous-chapitre.

INTRODUCTION

La structure sociale et spatiale des colonies d'insectes sociaux est favorable à la dissémination d'un entomopathogène. En effet, les individus qui la composent sont proches génétiquement et spatialement ce qui facilite l'impact du parasite puisqu'il peut être transmis par contact direct entre les congénères (Dimbi et al. 2013; Khun et al. 2021) et disséminé à l'intérieur du nid si l'immunité collective est déficiente (Stroeymeyt et al. 2018). Dans le cadre du biocontrôle, cette dissémination facilitée peut présenter un avantage lorsqu'il s'agit de lutter contre une espèce sociale mais également un risque pour les espèces sociales et non cibles. L'utilisation de *M. robertsii* a été proposée dans le cadre de la lutte contre le frelon asiatique (Poidatz et al. 2018b) puisqu'il impacte négativement leur survie. Cependant, des études sur *M. anisopliae sensu lato* ont démontré que selon les doses (Kanga et al. 2003; Smagghe et al. 2013), les formulations (Ball et al. 1994) et les applications (Rodríguez et al. 2009) de cet entomopathogène, les effets sur la mortalité des abeilles étaient variables, allant de négligeables (Smagghe et al. 2013) à conséquentes (Shaw et al. 2002). Par exemple, une application de *M. anisopliae* sous forme de poudre à une concentration 10^7 sp/g engendre moins de 25% de mortalité au bout de 6 semaines alors que lorsque cette même formulation est fixée à 10^9 sp/g, la mortalité des bourdons atteint 100% (Smagghe et al. 2013). Un autre exemple nous montre que lorsque le champignon est saupoudré sur et entre les cadres d'une ruche, la mortalité est plus importante (environ 55%) que lorsque les conidies sont estampillées sur du papier filtre positionné sur la moitié des cadres à l'intérieur

de la ruche (environ 5%) (Rodríguez et al. 2009). Dans les études de toxicité de *M.anisopliae sensu lato* sur les abeilles et les frelons, les protocoles sont non-standardisés et utilisent tous des espèces différentes de *Metarhizium spp.*, des tailles de groupes différents (individus seuls ou en microcolonies de tailles variables ou dans colonie entière), des lieux différents (sur le terrain ou en laboratoire), des doses et des formulations du parasite différentes. Toutes ces différences de protocoles entre les études rendent les comparaisons des effets de *Metarhizium spp* sur les espèces hôtes difficiles. Pour évaluer les risques sur les espèces non cibles, il est pourtant indispensable de pouvoir comparer les effets létaux entre les espèces cibles et non cibles avec les mêmes méthodes. C'est ce que nous avons proposé dans notre étude.

Nous supposons qu'en utilisant *M. robertsii* contre le frelon, des contaminations indésirables et interspécifiques pourraient avoir lieu. Potentiellement, elles interviendraient lorsque les frelons chassent de manière opportunistes d'autres pollinisateurs (Ueno 2015) et en cas de contact avec la proie sans succès de capture. Elles pourraient également intervenir lorsque des frelons infectés se poseraient sur une fleur pour collecter du nectar ou à l'entrée des ruches lorsqu'ils chassent les abeilles domestiques. En effet, il a été montré que les pollinisateurs peuvent agir comme vecteur d'entomopathogène puisqu'un individu chargé de spores en dépose sur la fleur visitée (Kapongo et al. 2008).

De plus, nous faisons l'hypothèse que *M. robertsii* pourrait avoir des effets différents sur les espèces en fonction de leur origine et histoire évolutive. En effet, les frelons asiatiques nichant en hauteur et étant invasif en Europe, nous pouvons supposer qu'en utilisant un parasite absent de son aire de répartition d'origine et qui se trouve généralement dans les sols, ces derniers auraient peu de chances d'avoir rencontré ce champignon au cours de son évolution et de ce fait, n'aurait pas pu développer des moyens de lutte adaptés, contrairement à d'autres espèces non cibles.

Nous avons voulu étudier les effets létaux de *Metarhizium robertsii* sur plusieurs espèces sociales et pollinisatrices et à différentes concentrations afin d'évaluer les risques en cas de contaminations non désirables. Nous avons également voulu comparer le rôle de l'histoire évolutive (invasive, non-invasive

en Europe) et de l'écologie (niche sous-terraine ou aérienne) des espèces sur leur susceptibilité à cet entomopathogène. Pour cela, nous avons exposé des frelons asiatiques, des guêpes communes et des bourdons à différentes concentrations de parasite et avons suivi leur mortalité pendant 8 jours.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Insectes

L'ensemble de ces expériences ont été réalisées de 2021à 2023. Nous avons utilisé 4 nids sauvages de frelon asiatique, 1 nid sauvage de guêpe commune et 4 colonies commerciales de bourdons (voir Tableau 5). Nous avons prélevé les adultes des colonies et nous les avons regroupés en microcolonies. Les microcolonies de frelons, de guêpes et de bourdons consistaient en des boîtes en plastique (225cm²) contenant 10±3 individus. Sur les nids sauvages, le nombre d'individus varie d'un nid à l'autre et nous avons constitué au mieux les microcolonies avec le nombre d'adultes disponibles. Chaque microcolonie a disposé, *ad libitum*, d'eau sucrée (40% v/v) et d'eau non-sucrée ainsi que du pollen (mélange de pollen commercial toutes fleurs).

Traitements

La souche de champignon, sa culture et le mode d'infection utilisé est décrit dans la partie Matériel et Méthode du Chapitre 4 section *M. robertsii* et *Mode d'infection.* Dans les expériences suivantes, les concentrations de spores dans les solutions ont été fixée à 10^7 sp/ml ou à 10^3 sp/ml. Les individus de chaque microcolonie ont reçu un des trois traitements (Tableau 5) : contrôle, faible concentration (10^3 sp/ml), forte concentration (10^7 sp/ml).

Expérience de survie

Pendant 8 jours, nous avons quotidiennement relevé le nombre de morts et les avons retirés de chaque microcolonie. Nous avons également suivi la consommation de nourriture en pesant quotidiennement les contenants des solutions aqueuses (eau sucrée et eau). L'ensemble des individus de

ces expériences ont été conservés au congélateur afin de réaliser ultérieurement des analyses PCR pour identifier la présence/absence de *Metarhizium* dans leurs corps (décrit dans Matériel et Méthodes du Chapitre, section *Mode d'infection*).

Tableau 5

Détails sur les nids capturés. Histoire évolutive de l'espèce en Europe, type de niche, type d'élevage, nombre, origine, date de collection, taille approximative des nids et nombre de microcolonies constituées pour l'expérience à partir de chacun de ces nids.

	Frelon asiatique	**Guêpe commune**	**Bourdon**
Histoire évolutive Europe	Invasive	Non-invasive	Non-invasive
Niche	Aérienne	Sous-terrainne Occassionnellement aérienne	Sous-terraine
Type d'élevage	Sauvage	Sauvage	Industriel (Koppert)
Nombre de nids	4	1	4
Lieu d'origine (code département)	Laburgade (46) Bouliac (33) Bouliac (33) Cahors (46)	Saucats (33)	Pays-Bas Pays-Bas Pays-Bas Pays-Bas
Date de collecte	12/10/2021 18/10/2021 25/10/2021 28/11/2021	10/12/2021	08/06/2021 08/06/2021 08/06/2021 08/06/2021
Taille approximative (cm)	<30 30-80 30-80 >80	60-70	<20 <20 <20 <20
Microcolonie pour chaque traitement			
Contrôle	9	6	6
10^3 *sp/ml*	9		6
10^7 *sp/ml*	9	6	6

Analyses statistiques

Pour comparer les effets du traitement sur la survie et entre les espèces, nous avons utilisé un modèle de Cox a effet mixte (fonction *coxme,* package *survival,* Therneau 2023) avec le *traitement* en facteur fixe et la *microcolonie* en effet aléatoire. Pour les guêpes issues d'un seul nid mère, nous avons utilisé un modèle de régression proportionnel des risques de Cox (fonction *coxph,* package *survival,* Therneau 2023) avec le *traitement* en facteur fixe.

Pour comparer l'effet des espèces sur la survie et entre les traitements, j'ai de nouveau utilisé un modèle mixte de Cox avec *espèce* en facteur fixe et *microcolonie* en facteur aléatoire.

Ensuite, pour calculer une estimation de la courbe de survie pour chaque traitement au sein des espèces, nous avons utilisé la fonction *survfit* (package *survival,* Therneau 2023) avec le *traitement* en facteur fixe.

RÉSULTATS

Nous avons d'abord testé l'influence du niveau d'exposition à *M. robertsii* sur la survie des individus et de chaque espèce (Figure 31). Les frelons exposés à un niveau faible de spores vivent moins longtemps que les frelons appartenant au groupe contrôle, contrairement aux bourdons qui vivent aussi longtemps (Tableau 6 pour statistiques). En revanche, les individus ayant été exposés à des niveaux forts de spores meurent plus rapidement que les individus contrôle et ceux exposés à de faibles concentrations (Tableau 6). De ce fait, une forte exposition au parasite réduit la durée de vie de tous les insectes et cet effet est corrélé au niveau d'exposition. L'écart de survie entre les traitements est plus grand chez les frelons asiatiques que chez les bourdons (Cox, Frelon asiatique : *Traitement :* X^2=73,425, df=2, p<0,001 ; Guêpe : *Traitement :* X^2=40,665, df=1, p<0,001 ; Bourdon : *Traitement :* X^2= 7,876, df=2, p=0,019). Ces résultats nous indiquent que les espèces non cibles (guêpes et bourdons) sont moins susceptibles aux spores que les frelons asiatiques.

Nous avons ensuite comparé les effets du parasite sur la survie entre les espèces et pour chaque traitement. Sans aucune exposition aux parasites (groupe contrôle), les frelons et les guêpes ont une durée de vie similaire et ont une probabilité de survie supérieure à celle des bourdons. Avec une exposition au parasite à faible ou forte concentration, les frelons et les guêpes vivent plus longtemps que les bourdons. A forte concentration, les guêpes survivent mieux que les frelons (Tableau 7 pour statistiques) (LT50 : *Letal Time 50* : latence avant que la moitié des individus meurent ; $LT50_{frelons_10^7\ sp/ml}$ =4 jours, $LT50_{guêpes_10^7\ sp/ml}$ =5 jours, $LT50_{bourdons_10^7\ sp/ml}$ =2 jours). Les frelons et les guêpes survivent plus longtemps que les bourdons.

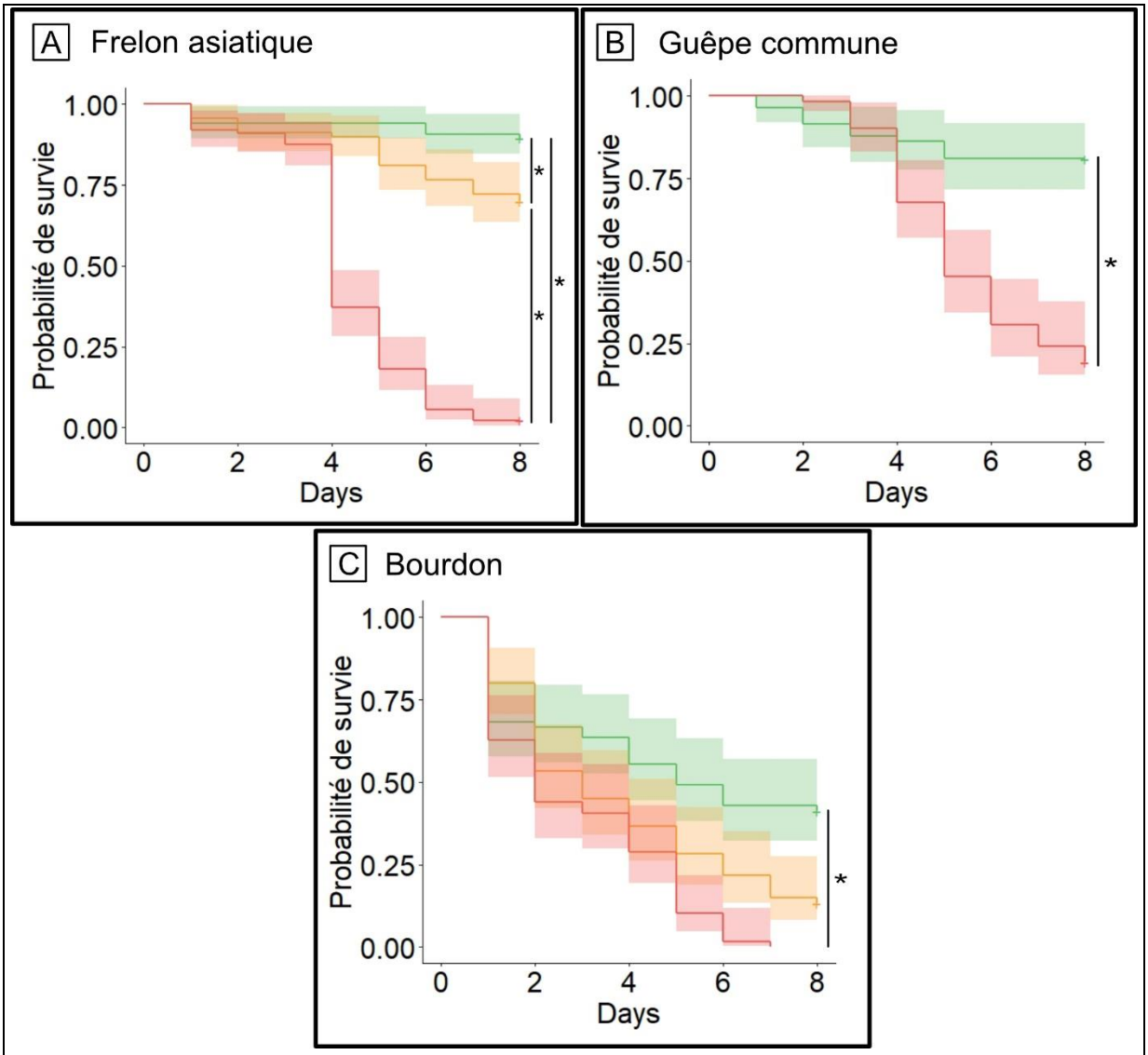


Figure 31

Probabilité de survie pendant 8 jours des trois hyménoptères testés : A) Le frelon asiatique, B) la guêpe commune, C) le bourdon. Nous avons exposé les insectes à trois traitements : contrôle (vert), faible exposition aux spores (10^3 sp/ml, orange), forte exposition aux spores (10^7 sp/ml, rouge). Les lignes pleines représentent les données expérimentales et l'intervalle de confiance à 95%.

Tableau 6

Comparaison de la probabilité de survie en fonction des traitements et au sein de chaque espèce. Traitements : C (contrôle), L (faible exposition aux spores), H (forte exposition aux spores). HR : *Hazard ratio,* IC : Intervalle de confiance à 95%, p.

Espèce	***Comparaison traitement***	***HR***	***IC***	***p-value***
Frelon asiatique	*C v.s. L*	3,159	1,211-8,241	0,0484
	C v.s. H	36,833	14,576-93,078	<0,001
	L v.s. H	11,661	5,500-24,724	<0,001
Guêpe commune	*C v.s. H*	6,425	3,316-12,451	<0,001
Bourdon	*C v.s. L*	1,915	0,872-4,208	0,238
	C v.s. H	4,012	2,232-7,212	0,014
	L v.s. H	1,614	0,756-3,442	0,431

Tableau 7

Comparaison de la probabilité de survie entre les espèces et au sein de chaque traitement. Espèce : FA (frelon Asiatique), GC (Guêpe Commune), B (Bourdon). HR : *Hazard ratio,* IC : Intervalle de confiance à 95%, p.

Traitement	***Comparaison espèce***	***HR***	***IC***	***p-value***
Contrôle	*FA v.s. GC*	1,382	0,225-8,457	0,935
	FA v.s. B	10,623	2,073-54,442	0,013
	GC v.s. B	7,685	1,277-46,257	0,067
Faible exposition	*FA v.s. B*	8,354	3,078-22,669	<0,001
Forte exposition	*FA v.s. GC*	0,443	0,248-0,719	0,004
	FA v.s. B	1,747	1,046-2,918	0,083
	GC v.s. B	4,133	2,311-7,395	<0,001

DISCUSSION

Nous avons exposé 3 espèces d'hyménoptères à différentes concentrations de *M. robertsii*¸ un entomopathogène récemment décrit pour ses capacités à infecter le frelon asiatique (Poidatz et al. 2018b). Nos résultats indiquent qu'en fonction du niveau d'exposition, ce parasite a un effet négatif sur la survie de ces trois espèces. Sur toute la durée de l'expérience, les bourdons ont une survie réduite en comparaison aux frelons et aux guêpes. Les frelons asiatiques sont plus susceptibles aux traitements aux spores que les guêpes et les bourdons.

Nos résultats montrent que les individus exposés à de fortes concentrations de spores meurent plus rapidement que les individus exposés à une solution contrôle et ce, pour les trois espèces testées. De plus, nous avons remarqué que pour l'ensemble des traitements auxquels les bourdons sont exposés, ils meurent plus rapidement et qu'ils sont plus susceptibles aux traitements aux spores que les frelons et les guêpes. Cependant, l'écart de mortalité entre les individus contrôle et ceux exposés à fortes concentrations est moins important chez les bourdons.

Nous avions formulé l'hypothèse que les bourdons seraient moins sensibles aux spores puisqu'ils nichent en Europe et dans les sols, là où se retrouve *M. robertsii* (Meyling and Eilenberg 2007). De ce fait, les bourdons auraient déjà rencontré à plusieurs reprises *M. robertsii* au cours de son évolution. En effet, des cas d'exposition naturelle des bourdons à *Metarhizium spp.* avaient déjà été recensés (Macfarlane et al. 1995; Schmid-Hempel 2001). Nous avons supposé que dans un contexte de coévolution hôte-parasite, ces derniers auraient développé une plus grande résistance à ce parasite (Bérénos et al. 2009). Nos résultats corroborent l'hypothèse que nous avions formulé puisqu'ils montrent que les boudons sont moins sensibles aux spores que les autres espèces sauvages de frelons asiatiques (invasif, niche aérienne) et de guêpes (locale, niche sous-terraine ou aérienne). Cependant, la forte mortalité des bourdons dans nos expériences pourrait s'expliquer par la santé des colonies que nous avons reçues : ces dernières étaient moins actives qu'à la normale et paraissaient en mauvaise santé

(observations personnelles). L'explication alternative à leur forte mortalité serait liée à l'appauvrissement de leur diversité génétique. En effet, ces dernières proviennent d'élevages industriels (Koppert) dans lesquels la diversité génétique des colonies pourrait être appauvrie par rapport à des colonies sauvages. Chez les insectes, le manque de diversité génétique peut affaiblir les individus dans un environnement stressant (ici, notre dispositif expérimental) (Lewis et al. 2020) ou induire une plus grande susceptibilité à un parasite (Baer and Schmid-Hempel 1999) et de ce fait, augmenter leur mortalité (Kohlmeier et al. 2016). Il serait intéressant de répliquer ces expériences sur des colonies sauvages de bourdons afin de confirmer les effets létaux observés.

Notre étude souligne le fait que *M. robertsii* pourrait être dangereux pour les espèces non cibles en fonction de leur niveau d'exposition aux spores. A faible concentration, leur survie n'est pas impactée contrairement à une exposition à forte concentration. A forte concentration, le frelon asiatique est plus impacté que les espèces non cibles. Nous avons évalué les effets létaux de ce parasite mais nos résultats ne signifient pas que *M. robertsii* ne peut pas engendrer d'autres symptômes. En effet, des études ont montré que *M. anisopliae* pouvait altérer la reproduction des blattes (*Blatella germanica*) (Quesada-Moraga et al. 2004) ou la nutrition des drosophiles (Toledo-Hernández et al. 2018). Ces symptômes peuvent tout aussi bien impacter négativement la colonie et ne devraient pas être négligés. En effet, les populations de pollinisateurs déjà en déclin, peuvent devenir plus susceptibles aux maladies quand elles sont exposées aux pesticides (Goulson et al. 2015; Sánchez-Bayo et al. 2016). De plus, les potentiels biais de contaminations interspécifiques devraient être quantifiés au regard de la méthode d'application de l'agent biologique contre les frelons afin d'évaluer les risques réels.

SOUS-CHAPITRE 4.2 : EFFETS SUBLETAUX DE METARHIZIUM SUR LE FRELON ASIATIQUE

INTRODUCTION

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 4.1, *M. robertsii* affecte négativement la survie des frelons. Ces derniers, parmi les espèces testées, sont ceux qui sont les plus sensibles aux fortes concentrations de spores. A présent, je vais étudier les effets du parasite avant la mort de l'hôte. La LT50 des frelons à 10^7 sp/ml de spores étant d'environ 4 jours (Sous-chapitre 4.1,), je souhaite connaître les troubles comportementaux éventuels avant la mort des frelons. Cela permettrait d'évaluer l'efficacité de la méthode proposée et le risque de potentielles contaminations interspécifiques qui pourraient intervenir avant la mort de l'hôte.

Le parasite *Metarhirizium spp.* est connu pour affecter l'activité générale et les capacités locomotrices (marche et vol) de certaines espèces. En effet, en quantifiant l'activité générale de criquets (*Schistocerca gregaria*), des résultats montrent qu'à partir de trois jours post-infection, l'activité générale (locomotion, mouvement du corps) augmente (Arthurs and Thomas 2001). Il est également suggéré que leur activité d'alimentation est réduite ainsi que celle d'accouplement (Arthurs and Thomas 2001). Les criquets utiliseraient ce que l'on appelle une fièvre comportementale qui leur permettrait d'élever la température de leur corps, ce qui aurait des effets thérapeutiques contre l'infection (Clancy et al. 2018). Les auteurs suggèrent que l'augmentation de la locomotion ne serait, ici, pas un symptôme de la maladie mais correspondrait à un comportement de recherche d'un microclimat qui leur permettrait d'augmenter leur température du corps. Au contraire, 48h après exposition à une forte concentration de spores et lorsque des termites sont isolés, leur locomotion diminue. Ici, nous serions dans le cadre de symptôme de la maladie (Hassan et al. 2021). Une autre étude démontre une paralysie à 95% chez des vers de tabac exposés à *M. anisopliae*, paralysie définie comme l'impossibilité pour un ver de

se remettre à l'endroit lorsqu'on le positionne sur le dos, (Samuels et al. 1988). L'impact sur le vol est également un des symptômes d'une mycose à *Metarhizium spp.* Cela a été étudié chez les longicornes asiatiques (*Anoplophora glabripennis*) grâce à l'utilisation de moulin à vol (*flight-mill*) (Clifton et al. 2019) et chez les moustiques (Mehmood et al. 2022). Les individus exposés respectivement à *M. brunneum* et *M. anisopliae* ont des capacités locomotrices de vol réduites comparés à des individus sains.

Les capacités de déplacement du frelon asiatique sont indispensables au bon fonctionnement de la colonie. Ce dernier utilise le vol pour aller chasser ses proies, soit à l'entrée des ruches des abeilles domestiques (Monceau et al. 2013a) soit de manière opportuniste lorsqu'il est à la recherche d'autres insectes ou de nectar (Ueno 2015; Rojas-Nossa and Calviño-Cancela 2020b). Une fois de retour au nid, il doit distribuer la nourriture au couvain et donc marcher dans le nid.

Dans ce sous-chapitre, j'ai évalué l'impact de *M. robertsii* sur les capacités locomotrices du frelon asiatique afin d'évaluer la sûreté environnementale et l'efficacité de notre méthode de biocontrôle des populations. Je me suis concentrée sur les activités de marche puisque c'est lorsque le frelon se déplace, à l'intérieur ou à l'extérieur du nid, qu'il est susceptible de faire des contaminations intra- ou interspécifiques. En effet, en se déplaçant à l'intérieur du nid pour réaliser plusieurs tâches (trophallaxie avec les adultes ou les larves, gestion des déchets, agrandissement du nid) qu'il pourrait transmettre le pathogène à d'autres congénères. C'est également en se déplaçant dans son environnement extérieur qu'il pourrait déposer des spores sur un support type planche d'envol des ruches (pendant chasse) (Monceau et al. 2013a) ou sur des fleurs (pendant recherche de nectar) (Ueno 2015) et qui serait transmis aux prochains passages d'autres espèces. Il est également plausible qu'un frelon infecte un individu d'une autre espèce qu'il est en train de chasser, en l'attrapant et en le laissant accidentellement s'échapper (observations personnelles). Pour cela, nous avons quantifié quotidiennement l'activité générale des frelons jusqu'à 3 jours post-infection.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Insecte

Nous avons réalisé ces expériences sur des frelons asiatiques provenant de deux nids prélevés en milieu naturel le 07/12/2021 à Bordeaux.

Tableau 8

Tableau récapitulatif des nids de frelons collectés. Date de capture, lieu de capture, code postal : code postal du lieu de capture, date expérience : date de début de l'expérience, Taille : diamètre approximatif du nid (en cm), Contrôle : nombre de microcolonies constituées appartenant au groupe contrôle, Infecté : nombre de microcolonies constituées appartenant au groupe exposé aux spores.

Date de capture	Lieu de capture	Code postal	Date expérience	Taille	Contrôle	Exposé
07/12/2021	Bordeaux	33	07/12/2021	<80	4	3
07/12/2021	Bordeaux	33	07/12/2021	<150	3	3

Traitements

La souche de champignon, sa culture et le mode d'infection utilisé sont décrits dans la partie Matériel et Méthode générale, section *M. robertsii* et *Mode d'infection.* Dans les expériences suivantes, nous avons utilisé un traitement à forte concentration de spores (10^7 sp/ml).

Nous avons prélevé les adultes des deux nids sauvages. Nous les avons regroupés en microcolonies de 10 individus (Tableau 8). Les individus de chaque microcolonie ont reçu un des deux traitements: (1) Contrôle : l'ensemble des individus a été immergé dans une solution contrôle et (2) Exposé : l'ensemble des individus a été immergé dans une solution de spores.

Locomotion

Afin de quantifier l'évolution des capacités locomotrices de marche au cours du temps, nous avons suivi l'activité générale des frelons par enregistrement vidéo à t+24h, t+48h et t+72h post infection.

Chaque individu a été marqué à la peinture (Apiculture Remuaux, peinture pour reines) sur le thorax et l'abdomen avec un code couleur personnalisé afin de nous permettre de reconnaître les frelons de manière individuelle. Chaque jour, nous avons réalisé 5 enregistrements vidéo (appelés ci-après *passage*) de l'activité générale de 9 frelons simultanément. Ces 9 frelons ont été prélevés de manière aléatoire dans les microcolonies des deux traitements et dans les minutes précédant leur passage. Nous les avons déposés individuellement dans une boîte de Petri (Ø 150 cm) percée de petits trous pour permettre l'aération. Dans le noir, nous avons déposé les boîtes de Petri contenant les frelons sur un panneaux lumineux pouvant diffuser une lumière homogène (Figure 32A). Ce panneau lumineux est une surface lisse blanche sous laquelle se trouvent des LEDs (6015 COD LED Strip, cold white).

Une fois le panneau allumé et la lumière diffusée, nous avons filmé les frelons pendant 15 minutes à l'aide d'une caméra fixée au-dessus du panneau. Après chaque passage, nous avons remis les frelons dans leur microcolonie d'origine.

Afin d'évaluer l'impact de *Metarhizium* sur les capacités de marche des frelons nous avons quantifié la durée des comportements de déplacement (l'individu est en mouvement) et de toilettage (l'individu passe une de ces pattes entre ces mandibules puis derrière ses antennes). Les comportements de toilettage ou hygiéniques permettent aux individus de réduire la quantité de spores présente sur leur cuticule (Yanagawa and Shimizu 2007). Pour cela, nous avons utilisé le logiciel gratuit Ethoc grâce auquel nous avons pu encoder les comportements observés sur les films (15 min) et extraire la durée de chaque comportement. Nous avons observé que les frelons mordaient la boîte de Petri et battaient des ailes mais nous avons décidé de ne pas retenir ces comportements dans nos analyses puisqu'ils ne présentent pas d'intérêt majeur pour répondre à notre question.

Grâce au logiciel Ethovision XT 7© qui permet de suivre de manière automatique la trajectoire des individus (Figure 32B), nous avons pu extraire 1) la distance (en cm) : distance totale parcourue pendant les 15 minutes d'observation, 2) la vélocité (en cm/sec) : la vitesse moyenne de déplacement

pendant l'observation, ainsi que 3) l'angle d'orientation (en deg) : l'angle moyen réalisé par un frelon lorsqu'il change de direction.

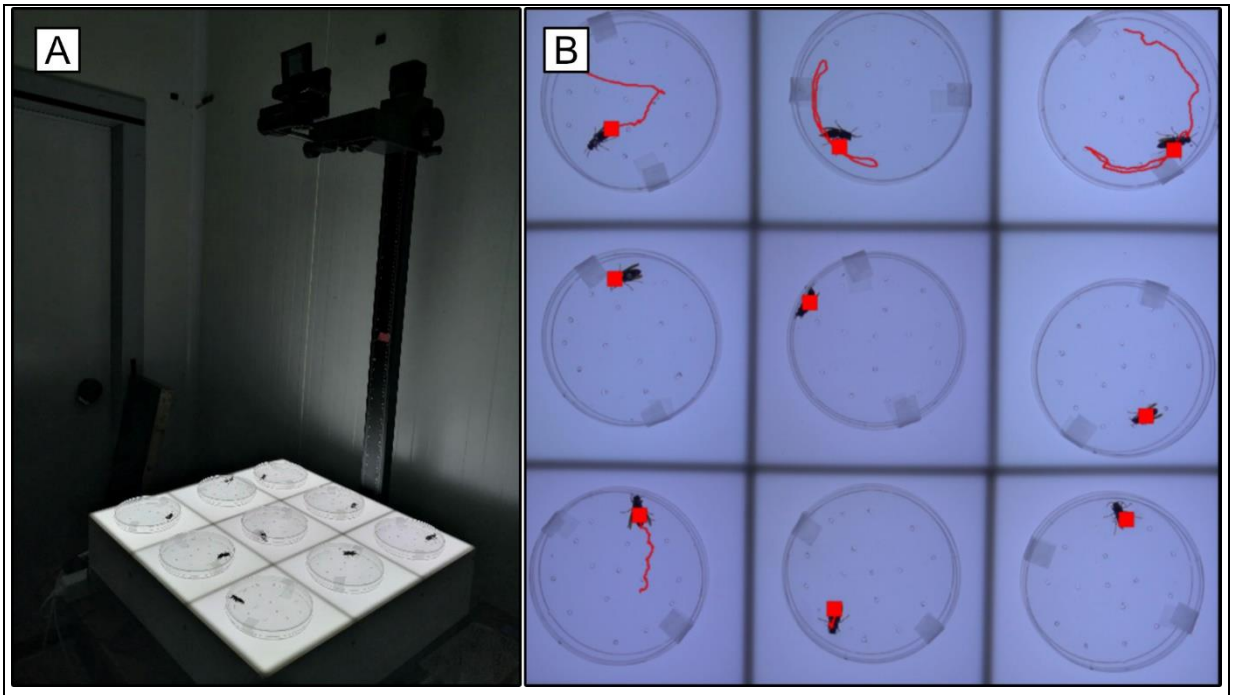


Figure 32
Dispositif expérimental pour suivre l'activité des frelons. A) Vue générale du dispositif expérimental. B) Les frelons sont dans des arènes et sont filmés afin de pouvoir suivre leurs trajectoires avec le logiciel Ethovision©.

Analyses statistiques

Pour comparer la durée des comportements, la distance totale parcourue, la vélocité moyenne et la sinuosité moyenne des trajectoires en fonction du traitement reçu, nous avons testé la normalité de nos données et réalisé des modèles linéaires mixtes (LMM, fonction *nlme*, Pinheiro et al. 2023) avec le *traitement* et le *jour* en facteur fixe et la *microcolonie* en facteur aléatoire. Nous avons ensuite réalisé des Anovas (fonction *car,* Fox and Weisberg 2019) sur ces modèles et des post-hocs de Tukey quand cela a été nécessaire.

RÉSULTATS

La durée de déplacement des frelons n'est ni influencée par le traitement ni par le jour post-exposition (Figure 333A)(LMM, Anova, *traitement :* X^2=0,939, df=1, p=0,333, *jour :* X^2=1,150, df=2, p=0,563). Le jour post-exposition n'influence pas la durée du toilettage (LMM, Anova, *traitement :* X^2= 14345, df=1, p < 0,001, *jour :* X^2=2,2, df=2, p=0,333). En effet, tous les jours, les individus infectés passent plus de temps à se toiletter que les individus contrôle (Figure 33B)(contrôle *v.s.* infecté, Jour 1 : df=11,6, t=-3,767, p=0,026 ; Jour 2 : df=11,6, t=-3,767, p=0,026 ; Jour 3 : df=11,6, t=-3,676, p=0,026 ; Annexe 5, Tableau 11 pour tous les résultats post-hoc). Pendant les trois jours post-infection, les individus infectés se toilettent plus longtemps.

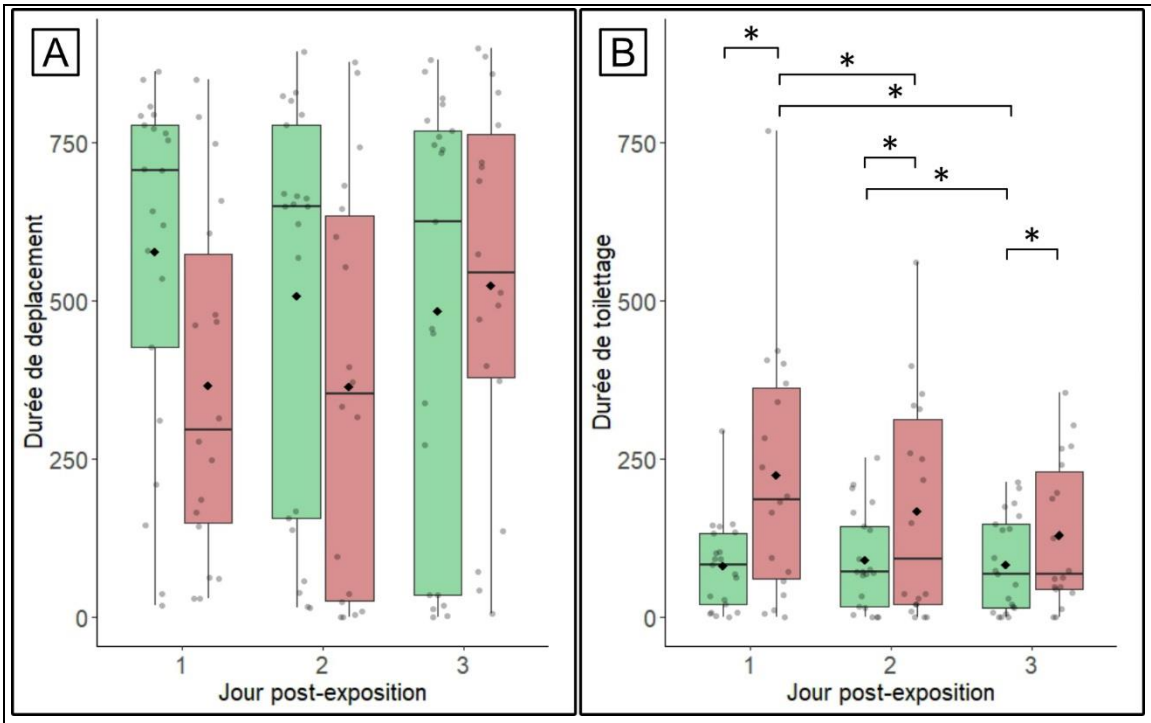


Figure 33
Durée d'expression des comportements A) de déplacement (en sec), B) de toilettage (en sec) pendant les 3 jours post-exposition à une solution contrôle (vert) et une solution de spores (orange). $N_{j1,\,C}$=21, $N_{j2,\,C}$=22, $N_{j3,\,C}$=21, $N_{j1,\,I}$=18, $N_{j2,\,I}$=17, $N_{j3,\,I}$=21. Points noirs : Moyenne, points grisés : données individuelles.

Le traitement et le jour post-infection n'influencent pas les paramètres de trajectoire des frelons. Le traitement et le jour post-infection n'influencent pas la distance parcourue (Figure 34A)(LMM, *traitement :* X^2=2,813, df=1, p=0,094, *jour :* X^2=1,31, df=1, p=0,519), la vitesse moyenne (Figure 34B)(LMM, *traitement :* X^2=1,033, df=1, p=0,31, *jour :* X^2=4,20, df=2, p=0,122) et la sinuosité des trajectoires par les frelons (Figure 34C)(LMM, *traitement :* X^2=0,867, df=1, p=0,867, *jour :* X^2=6,01, df=2, p=0,049, pas de différences entre les groupes après extraction des résultats post-hocs).

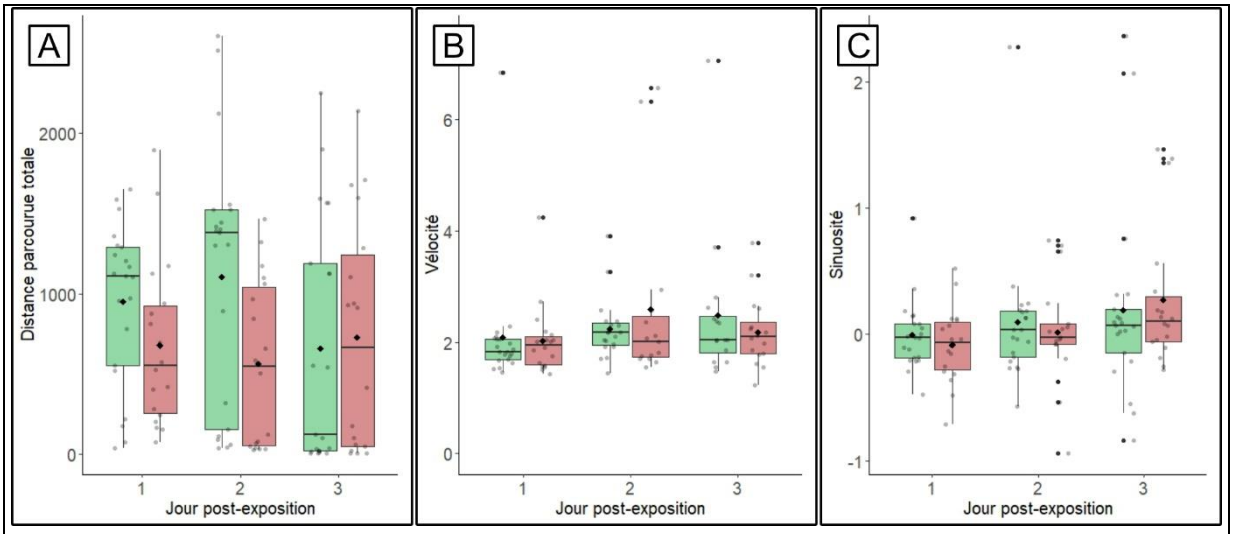


Figure 34
Paramètres des trajectoires de frelons en fonction du traitement reçu : A) Distance parcourue (en cm), B) Vélocité (en cm/s), C) Sinuosité (en degrés) pendant les 3 jours post-exposition à une solution contrôle (vert) et une solution de spores (orange). $N_{j1,\,C}$=21, $N_{j2,\,C}$=22, $N_{j3,\,C}$=21, $N_{j1,\,I}$=18, $N_{j2,\,I}$=17, $N_{j3,\,I}$=21. Points noirs : Moyenne, points grisés : données individuelles.

DISCUSSION

Nos résultats montrent qu'au moins pendant les trois jours qui suivent une exposition à *M. robertsii*, les frelons se toilettent plus que les individus exposés à une solution contrôle. Cependant, leurs capacités de déplacement (durée de déplacement, distance parcourue, vélocité et sinuosité) ne sont pas affectées par l'exposition au champignon entomopathogène.

Les frelons asiatiques exposés à *M. robertsii* se toilettent plus longtemps que ceux exposés à une solution contrôle. Chez les insectes sociaux, le toilettage entre congénères (*allo-grooming)* à une fonction efficace de protection contre les parasites qui, à ma connaissance, n'a pas encore été démontrée pour l'auto-toilettage (*self grooming).* En effet, chez les termites, lorsqu'ils sont élevés en groupe, le toilettage entre congénère permet de réduire activement le nombre de spores présents à la surface du corps de l'individu infecté et ces conidies sont éliminées par voies digestives. Elevés seules, les termites ne parviennent pas à diminuer la quantité de spores à la surface de leur corps (Yanagawa and Shimizu 2007). L'intensité du toilettage est différent en fonction du stade d'infection du parasite (Davis et al. 2018). Les fourmis exposées à *M. anisopliae* survivent mieux quand elles sont en groupe et lorsque la fréquence de toilettage entre congénères augmente (Okuno et al. 2012). Le toilettage peut aussi permettre la diffusion de sécrétion antifongique ou antimicrobienne et peut servir à réduire la probabilité que ces microorganismes endommagent l'intégrité de la cuticule des insectes (Zhukovskaya et al. 2013). L'augmentation de la durée du comportement toilettage chez frelons asiatiques montre qu'ils sont capables de détecter la présence des spores sur leur cuticule et d'avoir une réponse comportementale en conséquence. Nos résultats concordent avec l'augmentation de la durée de toilettage de guêpe Polistes exposées à des proies parasitées par *Metarhizium anisopliae* (Mayorga-Ch et al. 2021). Cependant, les résultats du chapitre 4.1 nous a démontré que des frelons infectés à *M. robertsii* avait une mortalité fortement impactée. Les conditions d'élevage étant similaires, nous pouvons supposer que les comportements d'auto-toilettage des frelons sont peu efficaces pour limiter l'effet du parasite.

Lorsque les frelons sont exposés à une solution de spores, ni la durée de déplacement, ni la distance parcourue, pas plus que la vitesse et la sinuosité des trajectoires ne sont altérées. L'impact de *Metarhizium spp* sur les capacités locomotrices des individus infectés avaient déjà été décrite chez d'autres espèces (Samuels et al. 1988; Clifton et al. 2019; Hassan et al. 2021; Mehmood et al. 2022). Cependant, nous ne retrouvons pas ces résultats dans nos expériences. Dans nos expériences, les individus à qui nous pouvions faire passer le test de locomotion étaient les individus qui avait survécu au fil des jours qui ont suivi l'exposition au pathogène ce qui peut biaiser nos résultats. Il est possible que les seuls individus testés aient été les plus résistants au pathogène et que de ce fait, ils n'aient pas eu de symptômes sublétaux. Pour de futures expériences, il serait intéressant d'avoir accès aux données de survie de chaque individu testé afin d'évaluer l'influence de la durée du toilettage sur la survie des individus. Nous pourrions ainsi tester si les individus se déplaçant le plus sont aussi les individus qui survivent le mieux et donc les moins touchés par le parasite. Nous pouvons également souligner la grande variabilité de nos données sur la durée de déplacement et la distance parcourue des individus, ce qui nous questionne d'autant plus sur le lien entre survie, déplacement et toilettage. Un nombre d'individus testés plus conséquent pourrait diminuer cette variabilité.

Les individus que nous avons étudiés ici ont été isolés pendant la réalisation des films, cependant le reste du temps, ils étaient en groupe. Nous ne pouvons exclure l'hypothèse que lorsque ces derniers se retrouvent en groupe, des comportements d'*allogrooming* puissent avoir lieu, comme cela a été identifié chez des guêpes Polistes (Mayorga-Ch et al. 2021). Il serait intéressant de compléter notre étude par une analyse des comportements de toilettage sur des frelons asiatiques en groupe en présence ou absence du parasite.

Dans le cas où de futures études confirmeraient nos résultats montrant que la locomotion des frelons asiatiques n'est pas impactée par une infection à *Metarhizium robertsii,* alors cela indiquerait que ces derniers continuent à se déplacer normalement avant leur mort. Ce point représenterait un avantage pour la transmission du pathogène au sein de la colonie mais un désavantage puisque les

risques de contaminations interspécifiques lors du fourragement ne sont pas limités. Pour compléter ces résultats, nous avons mis en place des expériences préliminaires afin d'évaluer l'impact de *Metarhizium robertsii* sur le vol des frelons asiatiques.

SOUS-CHAPITRE 4.3 : COMPORTEMENT DE DÉFENSE DES ESPECES NON CIBLES

INTRODUCTION

Pour éprouver une méthode de biocontrôle et évaluer l'ensemble des conséquences de son utilisation, il est important de tester son effet sur l'espèce cible (Chapitre 4.1 et 4.2) mais également sur des espèces non cibles. Dans le cadre de la lutte biologique contre le frelon asiatique, le pathogène que nous avons proposé, *M. robertsii*, impacte négativement la survie d'espèces non cibles telles que les guêpes et les bourdons (Chapitre 4.1). Dans ce chapitre je me suis intéressée aux moyens potentiels de défense que ces espèces non cibles peuvent mettre en place pour éviter une infection ou lutter contre sa propagation dans la population.

Chez les insectes sociaux, l'exposition à un parasite peut entraîner de lourdes conséquences à l'échelle de l'individu et de la colonie. L'infection d'un individu peut entraîner sa mort mais également différents troubles comportementaux qui peuvent perturber le fonctionnement de la colonie. Par exemple, une infection peut altérer l'efficacité de fourragement d'un individu et, par conséquent, réduire la quantité de nourriture disponible pour le reste de la colonie. C'est le cas des abeilles ou des bourdons, pour qui l'exposition à un parasite peut entraîner une perte totale ou partielle des capacités cognitives individuelles nécessaires au butinage (Gegear et al. 2006; Gómez-Moracho et al. 2022). En effet, lorsqu'ils sont exposés à *Nosema ceranae*, les bourdons montrent une réduction des capacités d'apprentissage olfactives (Gómez-Moracho et al. 2022) alors que lorsqu'ils sont exposés à *Crithidia bombi*, ce sont leurs capacités visuelles qui sont réduites (Gegear et al. 2006). Ces effets du parasite sur la cognition de l'hôte sont probablement liés à l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte. Chez le bourdon, une injection de lipopolysaccharides (LPS ; utilisé pour simuler une réaction immunitaire)

déclenche des troubles d'apprentissage des couleurs (Alghamdi et al. 2008) et une réduction de l'efficacité de butinage (Mobley and Gegear 2018). Chez l'abeille domestique, l'activation artificielle du système immunitaire induit une baisse de la performance d'apprentissage olfactif (Mallon et al. 2003). Dans le cas d'une infection d'une abeille domestique à un entomopathogène tel que *Beauveria bassiana*, la sensibilité aux sucres et les capacités d'apprentissage augmentent (Carlesso et al. 2020). La modification de la perception des sucres peut nuire à la capacité des individus à évaluer la récompense fournie par des fleurs ou bien les réserves de la colonie. Cette réduction des capacités cognitives des butineuses peut entraîner une malnutrition de la colonie et son déclin (Goulson et al. 2015).

Pour endiguer les effets d'un pathogène, les insectes ont développé des stratégies de défense au niveau individuel et collectif (Grüter et al. 2018). Certains sont par exemples capables de modifier leur consommation alimentaire pour lutter contre le pathogène via une stimulation de leur réponse immunitaire (Abbott 2014). Les chenilles (*Spodoptera exempta)* exposées à un virus (nucleopolyhedrovirus *Spodoptera exempta)* et restreintes à des régimes riches en protéines et pauvres en sucres (haut ratio Protéines : Sucres, P : S) survivent mieux que les chenilles restreintes à une régimes à faible ratio P : S. Quand elles ont le choix, les chenilles exposées au virus choisissent un régime plus riche en protéine (Povey et al. 2014). Ces phénomènes d'automédication semblent également se produire chez les pollinisateurs. Ainsi des bourdons infectés par *C. bombi* augmentent leur consommation de nectars riches en nicotine, ce qui a pour effet de retarder le développement du parasite (Baracchi et al. 2015a). Après une exposition à un champignon pathogène (*Ascophera apis*), le taux de consommation de résine augmente dans les colonies d'abeilles domestiques et diminue avec la prévalence du parasite (Simone-Finstrom and Spivak 2012). Certains insectes réduisent leur prise alimentaire, c'est ce qu'on appelle l'anorexie induite par la maladie. À la suite d'une exposition à *Metarhirizium spp,* plusieurs espèces (Orthoptères, Lépidoptères, Diptères) réduisent leur consommation alimentaire (Moore et al. 1992; Arthurs and Thomas 2001; Tefera and Pringle 2003; Toledo-Hernández et al. 2018). Cette anorexie réduit les risques d'ingérer plus de parasites et affame le parasite des micro- et macronutriments clés à son développement (Kyriazakis et al. 1998; Adamo et al. 2007).

Dans ce sous-chapitre, j'ai étudié la capacité d'une espèce sociale non cible, le bourdon, à lutter contre une infection à *M. robertsiiI.* Le bourdon terrestre est l'hôte de nombreux parasites et pathogènes tels que les virus, les bactéries, les champignons, les nématodes ainsi que d'autres arthropodes (diptères, parasitoïdes, acariens) (Schmid-Hempel 2001). C'est un modèle d'étude largement utilisé dans le cadre de travaux sur l'immunité individuelle et sociale chez les insectes (Schmid-Hempel 1998; Moret and Schmid-Hempel 2000; Brown et al. 2000). A l'échelle coloniale, les bourdons ont mis en place des comportements coopératifs pour prévenir et lutter contre les infections (i.e. immunité sociale). Par exemple, les ouvrières parasitées par une mouche parasitoïde ont tendance à passer la nuit hors du nid, ce qui retarde le développement des larves du parasite en raison des températures extérieures plus basses (Müller and Schmid-Hempel 1993). Les bourdons sont aussi capables de modifier leur prise alimentaire lorsqu'ils sont parasités : ils préfèrent du pollen dans des qualités et quantités qui conduiront à une réduction des effets du parasite au niveau de la colonie (Conroy et al. 2016; Spivak et al. 2019). J'ai donc fait l'hypothèse que les bourdons pourraient être capables de modifier leur comportement alimentaire pour lutter contre une infection à *M. robertsii* soit par anorexie induite par la maladie soit par automédication nutritionnelle. Je me suis concentrée dans un premier temps sur des stratégies individuelles qui sont plus facile à observer que des stratégies collectives.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de type *cafeteria* sur des bourdons ayant été exposés à *M. robertsii* (Simpson and Raubenheimer 2012). Nous avons suivi leur consommation de deux régimes pendant 5 jours et évalué le ratio de sucres/protéines ingérés en fonction du traitement reçu. En cas d'anorexie induite par la maladie nous nous attendions à ce que les bourdons infectés s'alimentent moins quelles que soient les régimes proposés et ce, dans les expériences de choix et non choix. En cas d'automédication, nous nous attentions à ce que les bourdons ajustent leur ratio S :C dans les expériences de choix en faveur d'un régime qui leur permette de survivre plus longtemps.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Bourdons

Nous avons conduit les expériences au CRCA (Toulouse, France) de janvier à septembre 2023. Nous avons utilisé 12 colonies de bourdons (Koppert, Pays-Bas). Depuis ces colonies mères, nous avons isolé 712 bourdons dans des boîtes de Petri (Ø9cm) aérées (couvercles percés). Chaque bourdon avait accès à de la nourriture *ad libitum* (voir paragraphe *Régimes artificielles)* et était maintenu dans une étuve, dans le noir à 26°C et 60% d'humidité relative. Chaque bourdon a reçu un des deux traitements : (1) Contrôle : exposition à une solution contrôle (n=239), (2) Infecté : exposition à une solution de spores fixée à 10^7 sp/ml (n=241) ou à 10^7 sp/ml (n=232). Pour confirmer la présence / absence de *M. robertsii* dans le corps des bourdons (et donc l'infection), nous avons réalisé des identifications du parasite par PCR sur chacun des individus. Ce travail est toujours en cours et les méthodologies sont décrites dans le Matériel et Méthodes du Chapitre 4, section *Mode d'infection*.

Metarhizium

La souche de champignon, sa culture et le mode d'infection utilisés sont décrits dans la partie Matériel et Méthode du Chapitre 4 (section *M. robertsii* et *Mode d'infection*). Dans les expériences suivantes, les concentrations de spores dans la solution ont été fixées à 10^3 sp/ml et 10^7 sp/ml. Nous nommerons les solutions contrôles : C, les solutions à 10^3 sp/ml : MR3, les solutions à 10^7 sp/ml : MR7. Nous avons défini la concentration subléthale de *M. robertsii* sur les bourdons en évaluant la survie de bourdons regroupés par 15 en microcolonies et exposés à ce pathogène pendant 8 jours. Dans cette expérience préliminaire, nous avons testé la gamme de concentration suivante : 10^7, 10^5, 10^3 spores/ml. Nous avons compté quotidiennement les morts et retiré les cadavres des microcolonies. D'après les résultats de cette expérience, 10^3 spores/ml correspond à la concentration subléthale (Annexe 6, Figure 43).

Régimes

Nous avons nourri les bourdons avec des régimes liquides préparés d'après Kraus et al. (2019). Les régimes avaient des ratios en sucres et protéines (S :P) différents : 199 :1 (D1, diète 1, riche en sucres) et 4 :1 (D2, diète 2, riche en protéines). Les deux régimes avaient la même quantité absolue de nutriments (410.95 ± 8.47 g/kg). Les nutriments ont été sélectionnés d'après (Kraus et al. 2019) et sont communément utilisés chez les insectes (Cohen 2015). Les sucres utilisés sont ceux que l'on retrouve communément dans le nectar des fleurs (Nicolson and Thornburg 2007; Nicolson 2011). Le mélange de sucres (respectivement pour D1 et D2, 39.8% et 32% de la diète totale) contenait du sucrose (Interdis, Massy, France), du fructose et du glucose (Louis François, Paris, France). Le mélange de protéines (0.2% et 8% de la diète totale) contenait les ingrédients suivants : soja, riz (MyProtein, Manchester, England) et 10 acides aminés libres essentiels (valine, méthionine, isoleucine, leucine, thréonine, phénylalanine, lysine, histidine, arginine et tryptophane) (Fisher Scientific, Strasbourg, France). Dans chacune de ces régimes, nous avons ajouté un mélange de vitamines pour insectes (5g/kg, Vanderzant vitamins mix, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), de la gomme de Xant (1.2 g/kg, Labo&Gato, Bordeaux, France), de la gomme de Guar (1.2g/kg, Labo&Gato, Bordeaux, France) et de l'eau minérale en complément jusqu'à obtention d'1 kilo de diète. Nous avons utilisé les gommes comme agents émulsifiants et épaississants pour faciliter le mélange des protéines dans l'eau (Kraus et al. 2019). Le détail des recettes de chaque diète est décrit en Annexe 7.

Nous avons mélangé l'ensemble de ces nutriments avec un blender, les avons transférés dans des tubes de 1.5ml et les avons conservés au congélateur jusqu'au début de chaque expérience. Chaque jour, les tubes nécessaires étaient décongelés quelques minutes avant le début des expériences.

Expériences de cafétéria

L'utilisation d'expériences de *cafeteria* dans lesquelles les bourdons doivent choisir parmi une ou plusieurs régimes proposés est une méthode répandue pour évaluer leurs besoins et également les stratégies qu'ils emploient pour les atteindre (Lihoreau et al. 2018). Avec cette approche il a été démontré que les bourdons sont capables de réguler leur prise alimentaire en protéines, sucres et lipides (Vaudo et al. 2016; Ruedenaueur et al. 2020). J'ai utilisé ces concepts dans notre design expérimental. Nous avons réalisé deux expériences : une *expérience de non-choix* dans laquelle les bourdons avaient accès à une seule diète (diète 1 ou diète 2) et une *expérience de choix* dans laquelle ils avaient accès à deux régimes (diète 1 et diète 2). Les bourdons pouvaient se nourrir *ad libitum* dans à un tube de 1.5ml percé en leur extrémité contenant les régimes (Figure 35). Chaque jour, nous avons renouvelé les tubes et les régimes. Nous avons suivi pendant 5 jours consécutifs la consommation des régimes en pesant quotidiennement les tubes à leur entrée et sortie des boîtes de Petri.



Figure 35
Bourdon dans le dispositif expérimental pour l'expérience de choix. Le bourdon avait accès aux régimes dans des tubes percés à leur extrémité. Ici, le bourdon avait le choix entre un régime riche en sucres (de couleur jaune claire) et un régime riche en protéines (de couleur marron). Dans les expériences de non-choix, seul un tube d'une des deux régimes était présent dans la boîte de Petri.

Analyses statistiques

D'après les données brutes de consommation journalière de chacune des régimes 1 et 2 pour chaque bourdon, nous avons pu calculer la consommation cumulée de chaque bourdon au cours des cinq jours :

$$Q = \sum_{i}^{d} C$$

Où Q était la quantité cumulée totale consommée de la diète 1 ou 2 pendant les 5 jours; d était la durée de vie du bourdon pendant l'expérience (de 1 à 5 jours) ; C la quantité totale de diète collectée pendant les 5 jours (en mg).

Nous avons ensuite calculé la consommation de nutriments (sucres et protéines) de chaque bourdon jusqu'à sa mort, normalisée par sa durée de vie durant l'expérience :

$$N = \frac{Q \times 0.4}{d}$$

Où N était la quantité cumulée de nutriments consommés (sucres et protéines) de chaque bourdon avant sa mort ; Q était la quantité cumulée totale consommée de la diète 1 ou 2; d : la durée de vie.

Dans les expériences de choix et de non-choix, nous avons testé l'influence du traitement (C, MR3, MR7) sur la consommation totale respectivement, de la diète 1 et de la diète 2 en utilisant un modèle linéaire mixte respectivement pour chacune des régimes suivis d'une ANOVA. Dans ce modèle, nous avons utilisé le *traitement* en facteur fixe et la *colonie mère* en facteur aléatoire. Nous avons utilisé des post-hocs de Tukey (package lsmeans).

Dans les expériences de choix, à partir des données de consommation de chacune des régimes 1 et 2, nous avons pu calculer le ratio sucres : protéines (R) des consommations cumulées de chaque individu :

$$R = \frac{N_{sucres}}{N_{protéines}} = \frac{(Q_{diète1} \times 0.398) + (Q_{diète2} \times 0.32)}{(Q_{diète1} \times 0.002) + (Q_{diète2} \times 0.08)}$$

Nous avons ensuite testé l'influence du traitement (C, MR3, MR7) sur le ratio des consommations cumulées avant la mort des individus. Pour cela, nous avons réalisé un modèle linéaire mixte avec le *traitement* en facteur fixe, la *colonie mère* en facteur aléatoire puis nous avons réalisé une ANOVA.

Pour comparer les effets du traitement sur la survie des individus, nous avons utilisé un modèle de Cox à effet mixte (fonction *coxme,* package survival, Therneau 2023) avec le *traitement* en facteur fixe et la *colonie mère* en effet aléatoire. Nous avons ensuite réalisé des post hocs de Tukey. Ensuite, pour calculer une estimation de la courbe de survie pour chaque traitement au sein des espèces, nous avons utilisé la fonction *survfit* (package survival, Therneau 2023) avec le *traitement* en facteur fixe.

Afin de décrire la survie des individus en fonction de leur consommation en sucres et en protéines, nous avons réalisé une carte de chaleur (Kraus 2022) pour chaque traitement (C, MR3, MR7) en utilisant les packages *fields* (Nychka et al. 2021), *dplyr* (Wickham et al. 2023) et *sp* (Pebesma and Bivand).

RÉSULTATS

Test de l'anorexie alimentaire

Nous avons d'abord testé si l'exposition aux spores de *M. robertsii* induisait une anorexie alimentaire chez les bourdons. Pour cela, nous avons exposé les bourdons à différents traitements et leur avons imposé un des deux régimes pour suivre leur consommation et leur survie pendant 5 jours. Le traitement appliqué aux bourdons a influencé la quantité cumulée de nutriments consommés dans la diète 1 (Figure 36A)(LMM, X^2=20,259, df=2, p < 0,001). Les bourdons des groupes MR3 et MR7 ont eu une consommation plus basse de la diète 1 comparé aux bourdons du groupe C (post-hoc Tukey : C *v.s.* MR3 : p=0,001, C *v.s.* MR7 : p < 0,001, MR7 *v.s.* MR3 : p=0,868). De la même manière, le traitement appliqué aux bourdons a influencé la quantité cumulée de nutriments consommés dans la diète 2 (Figure 36B)(LMM, X^2=6,388, df=2, p=0,041). Les bourdons du groupe MR7 ont eu tendance à avoir une consommation plus faible de la diète 2 que les bourdons ayant reçu les autres traitements (post-hoc Tukey : C *v.s.* MR3 : p=0,932, C *v.s.* MR7: p=0,05, MR7 *v.s.* MR3 : p=0,112). Les bourdons exposés à une forte solution de spores ont donc montré une réduction de leur prise alimentaire par rapport aux bourdons faiblement ou non exposés et ce, pour chacune des régimes que nous leur avons imposés.

Les bourdons restreints à la diète 1 et exposés aux spores ont survécu aussi longtemps que les bourdons contrôle (Figure 37A)(C *v.s.* MR3 : HR=1,002, IC=0,625-1,607, p=1 ; C *v.s.* MR7 : HR=1,546, IC=0,988-2,419, p=0,136 ; MR3 *v.s.* MR7 : HR=0,433, IC=0,979-2,43, p=0,147). Lorsqu'ils ont été restreints à la diète 2, les bourdons exposés à de fortes concentrations de spores ont survécu moins longtemps que les bourdons contrôle ou exposés à de faibles concentrations de spores (Figure 37B)(C *v.s.* MR3 : HR=0,83, IC=0,509-1,356, p=0,738 ; C *v.s.* MR7 : HR=2,119, IC=1,314-3,418, p=0,006 ; MR3 *v.s.* MR7 : HR=2,552, IC=1,564-4,164, p < 0,001). Dans les expériences de non-choix, la survie des individus en fonction de leur traitement a été dépendante du régime auquel ils ont été restreints, avec une survie moindre chez les bourdons infectés et nourris avec un régime riche en protéines.

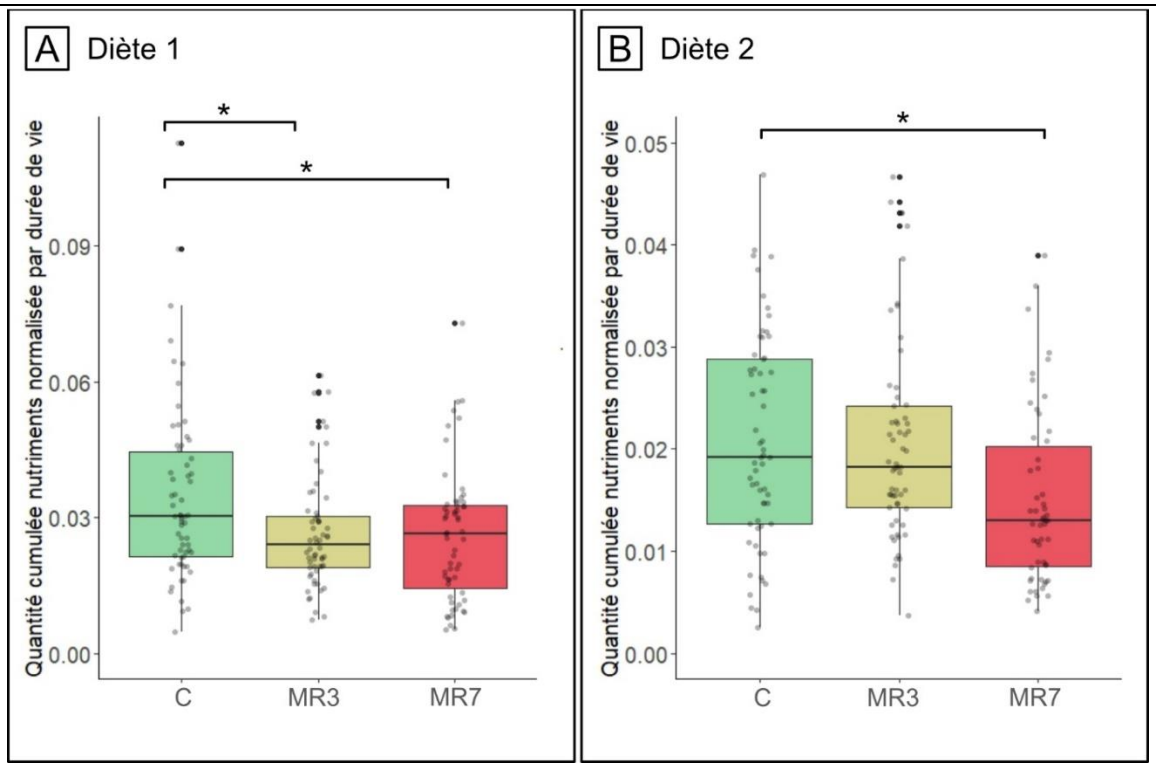


Figure 36

Expérience de non-choix : consommation de nutriments. Quantité cumulée de nutriments (en mg) consommés de A) la diète 1 (n_C=64, n_{MR3}=62, n_{MR7}=64) et de B) la diète 2 (n_C=61, n_{MR3}=62, n_{MR7}=56), normalisé par la survie des bourdons pendant les 5 jours d'expérience et en fonction du traitement reçu (vert : C, jaune : MR3, rouge, MR7) ($n_{non\text{-}choix\ total}$=369).

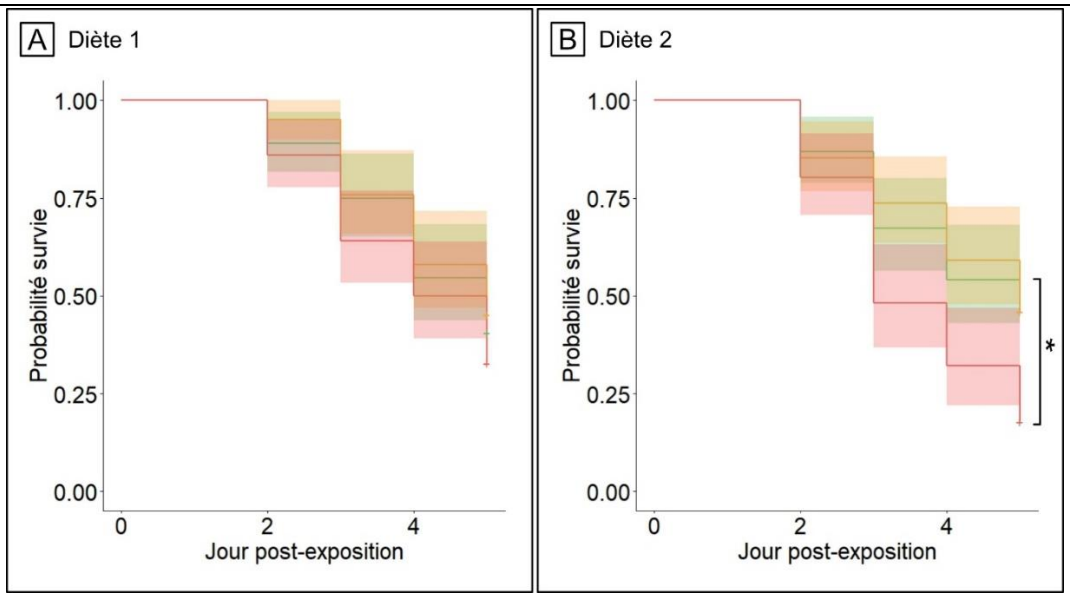


Figure 37
Expérience de non-choix : courbe de survie en fonction du traitement reçu. Probabilité de survie des individus traités avec une solution C (vert), MR3 (jaune), MR7 (rouge) lorsqu'ils sont restreints à A) la diète 1 et B) la diète 2.

Test d'une automédication alimentaire

Pour évaluer si les bourdons changeaient leur consommation de sucres et de protéines en fonction du traitement reçu, nous avons comparé les ratios de consommation cumulée des nutriments lorsque les bourdons avaient le choix entre les deux régimes. Le traitement a influencé la quantité cumulée de nutriments consommés par les bourdons (Figure 38A)(LMM, X^2=9,603, df=2, p=0.008). En accord avec les résultats des expériences de non-choix (Figure 36), les bourdons MR7 ont consommé moins de nutriments (sucres et protéines) que les bourdons MR5 et C (post-hoc Tukey : C vs MR3 : p=0,872, C vs MR7 : p=0,012, MR7vs MR3 : p=0,041). Ces bourdons exposés à de fortes concentrations de spores ont également montré une mortalité plus importante que les bourdons des autres groupes (Figure 39)(C *v.s.* MR3 : HR=1,424, IC=1,021-1,985, p=0,09 ; C *v.s.* MR7 : HR=2,577, IC=1,84-3,609, p < 0,001; MR3 *v.s.* MR7 : HR=1,81, IC=1,337-2,451, p < 0,001). Les bourdons exposés à de fortes concentrations de spores consommaient cependant les nutriments selon un ratio sucres : protéines équivalent aux bourdons n'ayant reçu qu'un nombre réduit de spores (MR3) ou aucun (C) (Figure 38B)(LMM, X^2=2,824,

df=2, p=0,244). Par conséquent les bourdons infectés à de fortes concentrations ont réduit leur consommation en nourriture sans changer leurs choix nutritionnels.

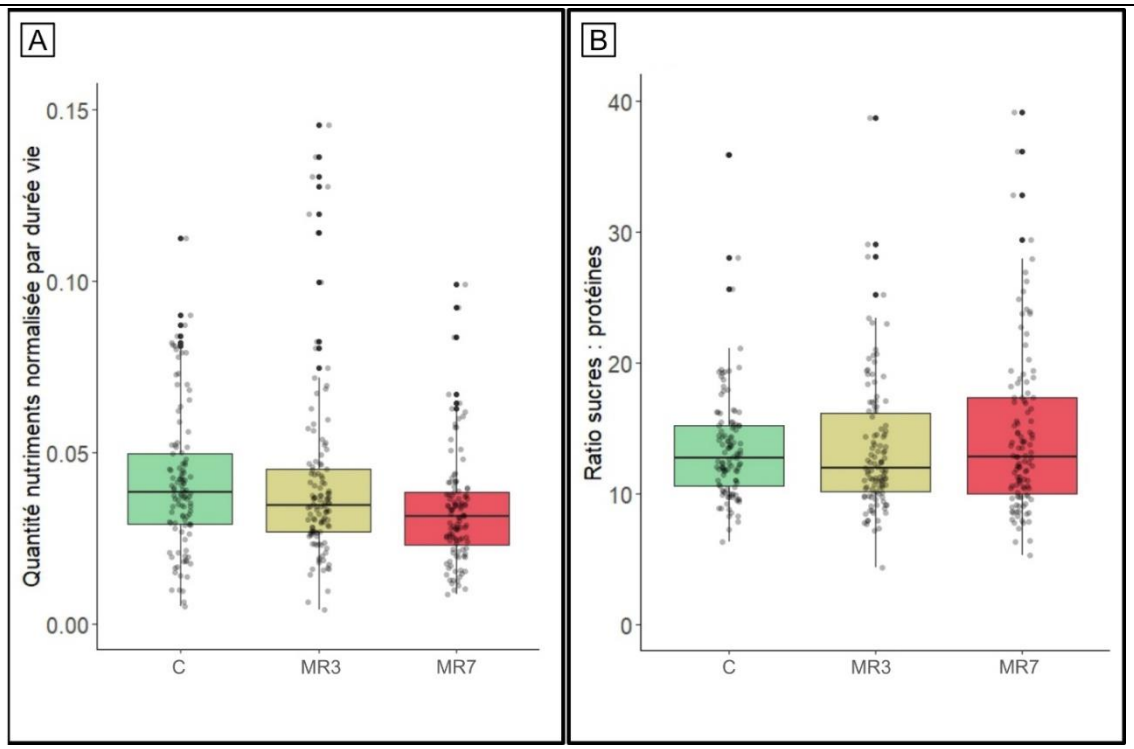


Figure 38
Expérience de choix. A) consommation cumulée des nutriments (en mg) des deux régimes (D1 + D2) (n_C=110, n_{MR3}=117, n_{MR7}=112), B) ratio de la consommation cumulée des nutriments sucres : protéines (n_C=110, n_{MR3}=117, n_{MR7}=112) ($n_{choix\ total}$=339).

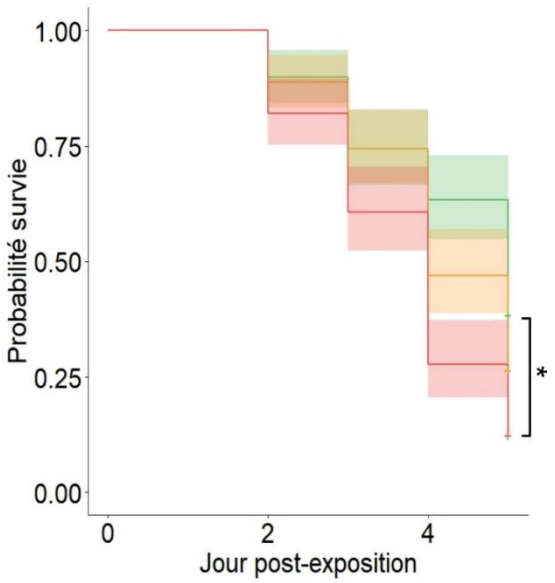


Figure 39
Courbe de survie en fonction du traitement reçu. Probabilité de survie des individus traités avec une solution C (vert), MR3 (jaune), MR7 (rouge) dans l'expérience de non-choix lorsqu'ils ont été restreints à A) la diète 1 et B) la diète 2

Prédiction de la survie en lien avec la consommation de nutriments

Nous avons ensuite analysé plus en détails la relation entre la consommation de sucres et de protéines et la survie des bourdons en fonction du traitement qu'ils ont reçu. Pour cela, nous avons réalisé des projections de survie des individus en fonction de leur consommation de sucres et de protéines ainsi que leur durée de vie pendant les 5 jours d'expérience. Dans les deux expériences, les individus du groupe C et MR3 ont mieux survécu quand ils ont consommé du sucre et des protéines (Figure 40A et 40C). Les bourdons du groupe MR7 ont mieux survécu quand ils ont consommé principalement des sucres (Figure 40B). La consommation de nutriments des bourdons a donc influencé différemment leur survie en fonction de leur traitement.

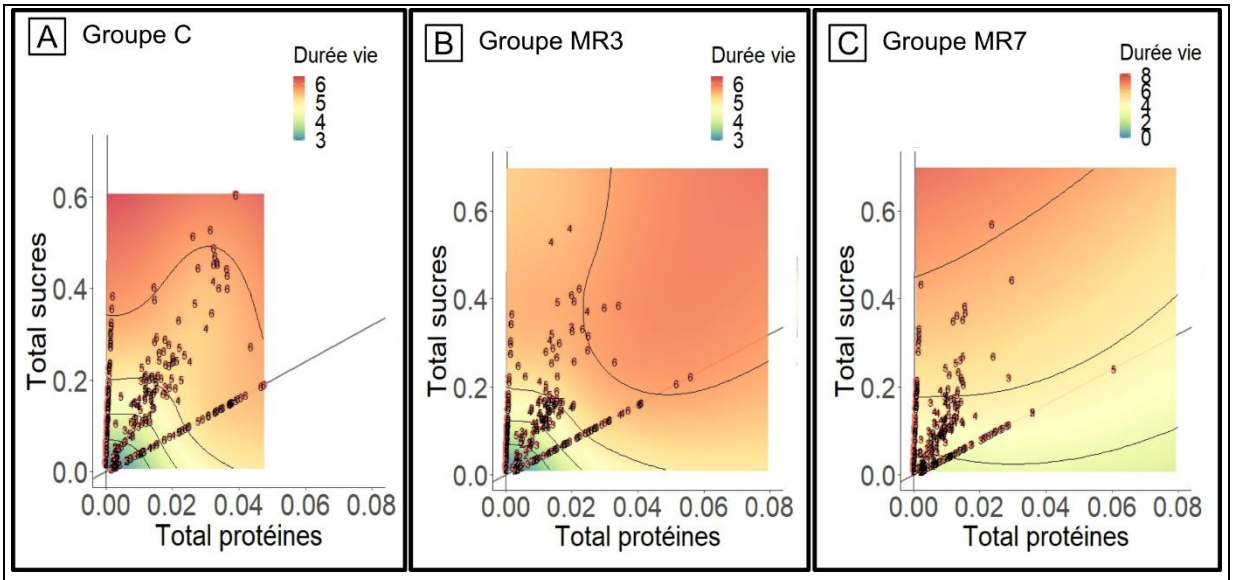


Figure 40

Expérience de choix et de non-choix, survie en fonction de la consommation total de sucres et de protéines. Chaque point représente la consommation d'un individu du groupe A) C, B) MR3, C) MR7.

DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de tester si les bourdons étaient capables de modifier leur comportement alimentaire en faveur d'un régime qui les aiderait à lutter contre une infection à *M. robertsii.* Nos résultats indiquent que, les bourdons exposés à de fortes concentrations de spores ont diminué leur consommation en nourriture, en accord avec l'hypothèse de l'anorexie alimentaire. Dans l'expérience de non-choix, la survie des bourdons exposés à de fortes concentrations de spores n'a pas été pas impactée lorsqu'ils ont été restreints à un régime riche en sucres, contrairement aux bourdons restreints à un régime riche en protéines. Dans l'expérience de choix, les bourdons exposés à de fortes concentrations de spores ont diminué leur consommation sans modifier leur ratio sucre : protéines, ce qui suggère une absence de modification de choix nutritionnels attendue selon l'hypothèse de l'automédication. Les individus C et MR3 ont une durée de vie plus longue lorsqu'ils se nourrissent à la fois de sucres et de protéines. Les individus MR7 survivent mieux quand ils ont un régime principalement composé de sucres.

Nos résultats montrent que les bourdons exposés à de fortes concentrations de spores ont une consommation de nutriments plus faible que les individus des autres groupes. La réduction de l'alimentation d'individus exposés à *M. anisopliae sensu lato* et *M. flavoviridae* a déjà été montrée chez plusieurs espèces d'insectes de l'ordre des Orthoptères, Lépidoptères, Coléoptères et Diptères (Moore et al. 1992; THOMAS et al. 1997; Amiri et al. 1999; Ekesi and Maniania 2000; Seyoum et al. 2002; Scholte et al. 2006). Cette altération de l'appétit peut être le résultat d'un symptôme de la mycose par l'utilisation des réserves de glycogène et de lipides par le mycélium (Zacharuk 1971). Elle peut également résulter d'un mécanisme de défense de l'hôte (une anorexie induite par la maladie) qui pourrait avoir plusieurs fonctions adaptatives telles que réduire le risque d'ingérer d'autres parasites, d'affamer le parasite résident qui détourne les réserves de l'hôte ou encore, d'améliorer les fonctions immunitaires de l'hôte (Adamo et al. 2007). Dans notre étude, la survie des bourdons exposés à de fortes concentrations de spores est prédite comme meilleure lorsque ces derniers consomment plus de sucres. Cependant, nos résultats montrent que les bourdons consomment globalement moins de

sucres. De plus, lorsque qu'ils sont restreints à un régime pauvre en sucres, leur survie est impactée négativement. Par conséquent, la réduction de leur consommation ne semble donc pas leur apporter d'avantages en termes de lutte contre l'infection à *M. robertsii* mais apparaît plutôt comme un symptôme de la maladie.

Bien que la prise alimentaire diminue lors d'une infection, les individus qui en ont la possibilité, peuvent faire varier les ratios de nutriments qu'ils consomment. Par exemple, lorsque la chenille légionnaire d'Afrique est infectée par un virus, elle sélectionne une alimentation avec un ratio protéines : sucres élevé qui stimule son système immunitaire et combat l'infection (Povey et al. 2014). Dans notre étude, les bourdons infectés en situation de choix alimentaire n'ont pas modifié leur ratio sucres : protéines, et leur survie était moins importante que celle des contrôles. Ils ne régulent donc pas leur consommation en faveur de leur survie. Ces résultats vont également dans le sens d'un changement de consommation symptômatique de la maladie.

La réponse comportementale de défense d'un hôte contre un pathogène peut être adaptée au niveau de spécificité de ce pathogène. Chez les bourdons, des études montrent que des métabolites secondaires du nectar de certaines fleurs possèdent une action antiparasitaire contre *C. bombi*, un parasite intestinal fréquent des bourdons (Manson et al. 2009; Koch et al. 2019). En laboratoire, les bourdons infectés par *C. bombi* augmentent leur consommation de diète riche alkaloïdes, ce qui diminue leur charge parasitaire (Richardson et al. 2015) et suggère une potentielle capacité d'auto-médication des bourdons. Dans notre étude, lorsqu'ils avaient le choix, les bourdons n'ont pas changé leur régime alimentaire vers un régime plus sucré, ce qui aurait amélioré leur survie lorsqu'ils étaient infectés. Malgré le signalement d'infection naturelle de *Bombus terrestris* à *M. anisopliae* (Macfarlane et al. 1995; Schmid-Hempel 2001), il est possible que sa prévalence dans les populations soit peu importante et qu'ils n'aient pas développé de mécanismes de défense spécifique à ce parasite pour se protéger de son infection (Bérénos et al. 2009). En effet, lorsque les bourdons sont exposés à deux sources de nour-

riture dont l'une est infectée par *C. bombi,* un parasite spécifique des bourdons*,* ils évitent le plus souvent cette source de nourriture. Ils évitent plus souvent une source de nourriture infectée par *C. bombi* que par *E.coli,* qui est un parasite commun non spécifique des bourdons. Cette étude souligne que les bourdons sont capables d'identifier et d'éviter un parasite et que le niveau d'évitement dépend de la spécificité du parasite (Fouks and Lattorff 2011).

Chez les insectes sociaux, les comportements de défense individuelle entraînent souvent des conséquences au niveau collectif et peuvent avoir lieu à différents moments de l'invasion du parasite dans la colonie. Ils peuvent limiter les individus à l'exposition au parasite dans l'environnement, limiter l'entrée, l'établissement et la diffusion du parasite à l'intérieur de la colonie ainsi que limiter sa transmission aux colonies voisines (Cremer et al. 2007). Par exemple, les fourmis qui sont naturellement et fréquemment infectées par *M. anisopliae sensu lato* (Cremer et al. 2007; Angelone and Bidochka 2018) ont développé différents comportements de défense contre ce parasite. En effet, les ouvrières de l'espèce *Mymica rubra* sont capables de détecter le potentiel infectieux d'un cadavre d'une proie et récupèrent préférentiellement ceux qui minimisent le risque pour la colonie (Pereira and Detrain 2020). Les ouvrières *Lasius niger* sont capables de modifier le réseau social à l'intérieur de leur colonie pour limiter la diffusion du pathogène dans le nid (Stroeymeyt et al. 2018). Il est possible que les bourdons aient d'autres mécanismes de défense contre ce pathogène qui ne mettent pas en jeu leur alimentation et qui agissent à d'autres niveaux.

De manière intéressante, nos résultats indiquent que la concentration reçue par le pathogène impacte la consommation en nutriments. En effet, les bourdons exposés à de fortes concentrations de spores diminuent leur prise alimentaire alors que les individus exposés à de faibles concentrations de spores ne la modifient pas en comparaison aux individus contrôle. Dans les expériences de non-choix et de choix, la survie des individus MR3 est identique à celle des individus C peu importe la diète qui leur est imposée. Dans le cadre du biocontrôle du frelon asiatique par l'entomopathogène *M. robertsii*, la présence d'un effet concentration sur la consommation de nutriments d'une espèce non cible est un

indice encourageant. En cas de contamination indésirable de colonies de pollinisateurs, nous supposons que si la concentration d'exposition des espèces non cibles ne dépasse pas les MR3 sp/ml, cela n'impactera pas la consommation alimentaire des bourdons. Cependant, si cette concentration est élevée (par exemple, de 10^7 sp/ml), nos résultats indiquent que les bourdons auraient une diminution de leur consommation qui n'impacterait leur survie. Des expériences complémentaires à l'échelle coloniale pourraient permettre de comprendre le phénomène dans son ensemble, c'est-à-dire, la transmission d'un pathogène dans la colonie à partir d'un individu exposé, son impact sur la nutrition générale de la colonie et du couvain, et ses conséquences sur la durée de vie de la colonie. Il serait toutefois intéressant de quantifier la concentration réelle à laquelle seraient exposés les bourdons en cas de contamination non désirables par la solution de biocontrôle que nous proposons.

REMERCIEMENTS

Je remercie Stéphane Kraus de m'avoir aidé à composer les recettes des régimes utilisés dans cette expérience.

DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous voulions évaluer l'efficacité de l'utilisation de *M. robertsii* contre le frelon asiatique et son impact potentiel sur les espèces non cibles. Pour cela, nous avons étudié les effets létaux de ce champignon sur plusieurs espèces d'hyménoptères, les effets subléthaux sur le frelon asiatique et les potentiels mécanismes de défense qu'une espèce non cibles pourrai développer contre ce parasite. Nos résultats indiquent qu'à faibles concentrations d'exposition, la survie des espèces cibles et non cibles n'est pas impactée. A forte concentration, toutes les espèces sont impactées par *M. robertsii* et les frelons asiatiques sont plus susceptibles que les espèces non cibles (Chapitre 4.1). Une fois les frelons infectés à forte concentration, leurs capacités locomotrices ne semblent pas réduites. En revanche, on observe une augmentation significative de leur comportement de toilettage. Ce comportement pourrait les aider à retirer les spores à la surface de leur cuticule (Chapitre 4.2). Les bourdons exposés à de fortes concentrations réduisent leur consommation alimentaire et quand ils ont le choix, ne parviennent pas à sélectionner une alimentation qui améliore leur survie. A faible concentration, aucun impact sur les quantités ingérées de nutriments n'est identifié (Chapitre 4.3). Afin de compléter ces résultats, nous avons réalisé une série d'expériences complémentaires pour lesquelles nous avons brièvement décrit les méthodes utilisées dans l'encadré 3. J'ai décidé de ne pas détailler ces expériences dans le manuscrit puisque les méthodes nécessitent d'être raffinées et les résultats sont encore au stade préliminaire ou en cours d'obtention.

Encadré 3 : Méthodologies des expériences complémentaires du Chapitre 4

Expérience supplémentaire 1 : Transmission du parasite entre les congénères

(1) Infection à *M. robertsii* (1 ml à 10^7 sp/ml)



(2) Prélévement



(3) Analyses PCR

Expérience supplémentaire 2 : Impact du parasite sur le vol du frelon asiatique En collaboration avec l'INRAe d'Orléans

(1) Contrôle + Infection à *M. robertsii* (10^7 sp/ml)

(2) Manège de vol à exposition t+24h et t+48h

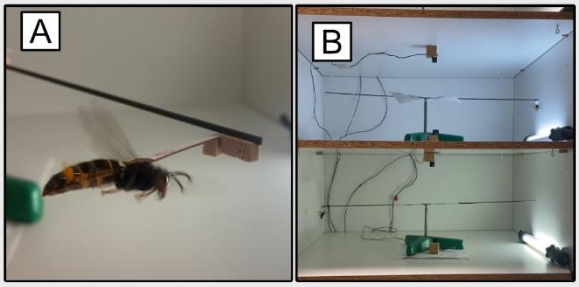


Figure 41 : Frelons infectés à *M. robertsii* attachés dans un manège de vol. A) Frelon attaché par le thorax dans le manège, B) Vue globale du manège. Source photo : Zoé Tourrain.

(3) Extraction et analyses des paramètres de vol

Expérience supplémentaire 3 : Impact du parasite sur l'activité d'un nid de frelons

(1) Tir de billes de paintball chargées de *M. robertsii* dans un nid de frelons

(2) Suivi de l'activité du nid pré- et post-tir

(3) Collecte du nid (infection + 14 jours), extraction des individus, mise en culture sur milieu

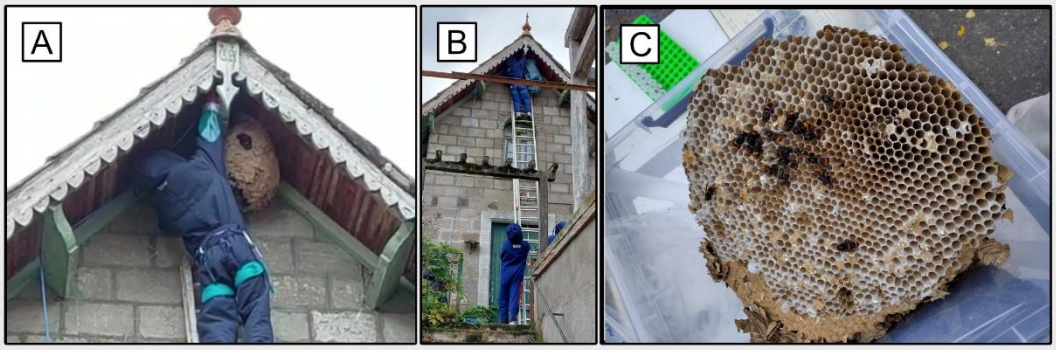


Figure 42 : Collecte et dépouille d'un nid de frelons asiatique après tirs de billes de paintball contenant *M. robertsii* : A) Décrochage d'un nid B) en hauteur, C) Galette contenant le couvain du nid décroché.

Nos résultats montrent que la survie des frelons asiatiques exposés à de fortes concentrations de parasites concordent avec les résultats présents dans la littérature (Poidatz et al. 2018b). Cependant, à faible concentration, le parasite n'impacte pas la survie des individus. Dans le cadre de la lutte biologique contre le frelon asiatique et la solution commerciale envisagée (tir de billes de paintball chargées d'entomopathogène dans les nids de frelons asiatiques) (Encadré 4), nos résultats soulignent l'importance de réussir à administrer des concentrations suffisamment importantes aux frelons pour garantir un effet sur leur survie.

Encadré 4 : Solution commerciale envisagée pour l'utilisation de *M. robertsii* contre le frelon asiatique



Figure 43
Solution commerciale envisagée pour le biocontrôle du frelon asiatique par *M. robertsii*. A) Un milieu liquide chargé de spores de *M. robertsii* est inséré dans B) des billes de paintball, C) Ces billes sont ensuite tirées sur les nids de frelons et explosent à l'intérieur, libérant ainsi les spores. Source photo : A) Fanny Vogelweith, B) Floriane Bacabara, C) © Photo NR (https://www.lanouvellerepublique.fr/indre/tirs-de-paint-ball-contre-frelons-asiatiques).

De manière surprenante, une forte concentration de spores de *M. robertsii* ne cause aucun impact sur la locomotion des frelons bien que ce soit le cas pour plusieurs insectes (Clifton et al. 2019; Hassan et al. 2021; Mehmood et al. 2022). En revanche, elle augmente leurs comportements de toilettage. Dans le cadre d'une utilisation commerciale de *M. robertsii* contre le frelon asiatique, le fait qu'il n'y ait pas d'impact du champignon sur la locomotion du frelon peut présenter un avantage puisque ses déplacements dans le nid pourraient favoriser la dissémination du champignon. En effet, chez les insectes sociaux, les patrons de mobilité peuvent modifier les interactions entre les individus et la dynamique de diffusion du parasite dans le nid (Stroeymeyt et al. 2014). L'augmentation des contacts augmente le risque d'infection (Otterstatter and Thomson 2007). Cependant, chez certaines espèces

telles que la fourmi *Lasius niger*, le réseau social est plastique et peut se réarranger de manière à lutter contre une infection (Stroeymeyt et al. 2018). Nous ne savons pas si c'est le cas chez le frelon. Nous avons mis en place des expériences pour évaluer le niveau de transmission du parasite entre adultes-adultes, couvain-couvain, des adultes vers le couvain et du couvain vers les adultes (Encadré 3).

Le fait que les capacités locomotrices des frelons n'aient pas été impactées par le parasite pourrait présenter un désavantage dans les risques de transmission interspécifique. Nous avons mis en place des expériences préliminaires pour évaluer l'impact du champignon sur les capacités de vol du frelon (Encadré 3, expérience supplémentaire 2). Dans le cas où les capacités locomotrices et de vol du frelon ne serait pas altérées par le parasite, ces derniers pourraient continuer à fourrager librement et de ce fait, disséminer les spores présents à la surface de leur cuticule. En effet, les spores peuvent se transmettre via un support sur lequel un individu parasité ce serait posé (Graystock et al. 2015; Poidatz et al. 2018b). Dans le cas du frelon, par exemple, une fleur ou la planche d'envol des abeilles.

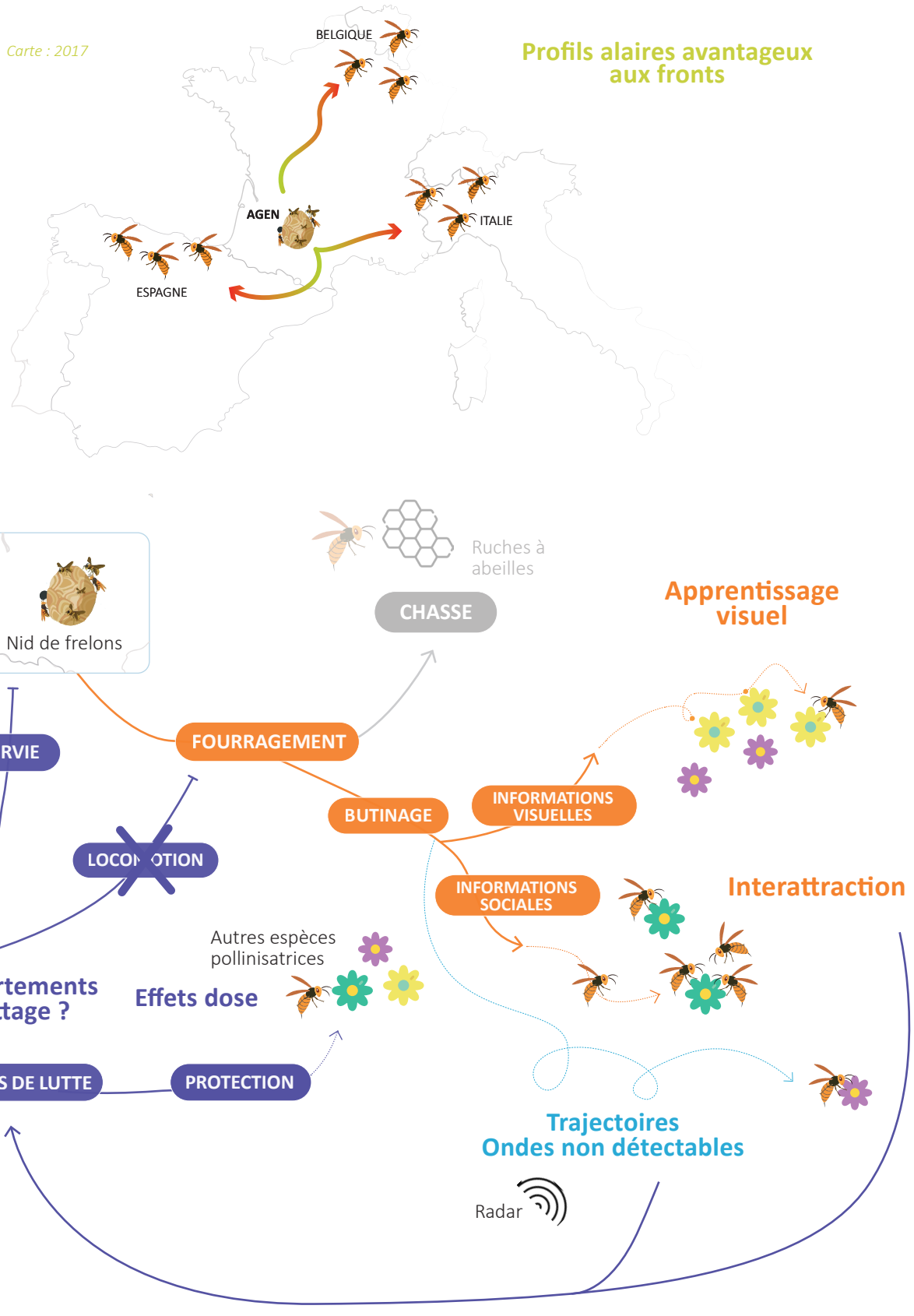
Nous avons également observé que les bourdons se nourrissaient moins quand ils étaient infectés à *M. robertsii* et c'est aussi le cas pour d'autres espèces d'insectes exposés à *Metarhizium spp* (Moore et al. 1992; Arthurs and Thomas 2001; Tefera and Pringle 2003; Toledo-Hernández et al. 2018). Chez les abeilles, des larves qui ont été exposées à un stress alimentaire vivent moins longtemps et deviennent des butineuses moins efficaces car elles commencent à butiner plus tôt, pendant moins de jours et leur danse indique de manière moins précise une source de nourriture (Scofield and Mattila 2015). Chez le frelon asiatique, ce sont aussi les ouvrières qui assurent le transfert de nectar et de protéines aux autres membres de la colonie (couvain, reine). Si les ouvrières s'alimentent moins alors nous pourrions envisager que par cascade, l'ensemble de la colonie serait moins nourri et se développerait moins bien. Il serait intéressant d'étudier le comportement alimentaire d'ouvrières exposées à *M. robertsii.*

Dans l'ensemble des expériences présentes dans ce chapitre, nous avons travaillé en conditions de laboratoire favorables au développement du champignon dans le corps de l'hôte (26°C, 60% d'humidité relative). Dans la nature, les nids de frelons, présents du mois de juin à fin novembre sont soumis à de nombreuses variations climatiques (températures, hygrométrie). L'enveloppe du nid est constituée de papier mâché et ne permet pas d'isoler complétement le nid des variations climatiques extérieures (Klingner et al. 2006). Chez les guêpes, les variations de températures peuvent être tamponnées par la thermorégulation du nid par des ouvrières (Martin 1990; Perez and Aron 2020; Stabentheiner et al. 2022). L'intérieur des nids de frelons, tels que ceux de *Vespa crabro* sont maintenus à environ 30°C et à une humidité relative entre 70-80% (Klingner et al. 2005), conditions favorables au développement de *M. robertsii.* La structure des nids de frelons favoriserait des conditions idéales de développement du parasite dans le nid et dans le corps des hôtes.

Chez de nombreux insectes sociaux, différentes stratégies existent pour limiter la propagation d'un parasite dans le nid tels que : l'évacuation des cadavres du nid (Cremer et al. 2007), l'exclusion des individus infectés (Cremer et al. 2007) ou bien le maintien de ces individus en marge du réseau d'interaction social (Stroeymeyt et al. 2018). Dans nos expériences en laboratoire, les frelons ne peuvent pas s'isoler de leurs congénères ou évacuer les cadavres contaminés de leur environnement proche puisqu'ils sont maintenus dans une boîte expérimentale. Nous pouvons supposer que de tels comportements hygiéniques, s'ils sont présents chez les frelons, ne pourraient pas être exprimés dans nos conditions. Cela pourrait expliquer, en partie, leur faible résistance aux fortes concentrations de spores (mortalité élevée). De plus, lors d'expériences préliminaires que nous avions réalisées pour tester le développement du champignon sur un support galette (Encadré 3, expérience supplémentaire 3), nous avons observé que lorsque nous déposions une solution de spores (10^7 sp/ml) sur des nymphes, le lendemain, les opercules avaient été ouverte par les ouvrières, et les corps des nymphes évacués des opercules. A l'échelle du nid, lorsque nous avions exposé un nid de frelon à des billes de paintball contenant des spores de *M. robertsii* (Figure 42, expérience supplémentaire 3) nous avons observé pendant les jours qui ont suivi, que les ouvrières évacuaient des bouts de billes et des larves

du nid. Ces comportements d'évacuation des cadavres ont également été observés dans des nids supposés sains sur lesquels j'ai travaillé dans le cadre d'autres expériences (observations personnelles). En récupérant ces nids plusieurs semaines après avoir tiré des billes d'entomopathogène à l'intérieur, nous avons constaté que les billes étaient invaginées dans la structure du nid. Les frelons avaient construit une nouvelle structure tout autour pour les isoler. Nous nous demandons alors : *est ce la présence d'un entomopathogène ou bien uniquement la présence d'un corps étranger (la bille) qui a conduit les frelons à les isoler ?* Les comportements de toilettage augmentent lorsque les individus sont exposés à de fortes concentrations de spores et lors d'observations préliminaires, nous avons constaté un comportement qui s'apparenterait à un comportement hygiénique connu chez d'autres hyménoptères qui consiste à évacuer les cadavres à la suite d'une infection. Les frelons semblent donc détecter la présence du champignon et pourraient alors avoir des comportements de défense contre les pathogènes. Il serait intéressant de pouvoir les étudier plus en détails et d'évaluer dans quelles mesures ces comportements, s'ils existent, sont efficaces.

DISCUSSION GÉNÉRALE



Graphisme : Marielle Planques

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de ma thèse était d'étudier le comportement et l'écologie des populations invasives de frelon asiatique afin d'améliorer les moyens de lutte existants et d'en proposer de nouveaux. Pour cela, je me suis intéressée aux mécanismes qui expliquent la rapidité de son invasion, ainsi qu'aux capacités cognitives et aux comportements qui lui permettent d'identifier des sites de nourriture. En complément de ces recherches fondamentales, j'ai testé l'utilisation d'un nouvel outil radar pour quantifier les mouvements de frelons dans leur environnement naturel sans perturber leurs comportements. Dans le futur, cet outil pourrait permettre d'étudier les déplacements des frelons et de localiser des nids. J'ai également exploré une nouvelle piste de biocontrôle par l'utilisation du champignon entomopathogène *M. robertsii*. Cette méthode de lutte pourrait contribuer à la réduction des populations de frelons asiatiques tout en limitant les effets indésirables sur les espèces non cibles, et en particulier les abeilles.

1. La dispersion du frelon et son adaptabilité dans les nouveaux milieux

Mes travaux ont permis de mieux comprendre la rapidité d'invasion des frelons asiatiques en Europe. En effet, notre collecte de spécimens à grande échelle par science participative a mis en évidence que les fondatrices de frelons asiatiques ont des profils alaires particuliers (ailes plus longues et avec un plus grand *aspect ratio*) sur les fronts d'invasions que dans les régions où les populations sont établies (Chapitre 1). Cependant, nous n'avons pas pu distinguer avec certitude les processus évolutifs qui ont conduit à l'apparition de ces phénotypes. Ils pourraient résulter d'un processus de tri spatial comme cela a déjà été décrit chez le crapaud buffle (Phillips et al. 2006), d'un phénomène de sélection naturelle, ou d'une combinaison des deux. Pour le vérifier, des expériences complémentaires sont nécessaires. Pour confirmer l'hypothèse de la présence d'un tri spatial et écarter celle de la sélection naturelle, il serait important de vérifier que les profils alaires plus dispersifs ne représentent aucun

avantage, voire un coût, par exemple à travers une diminution du succès reproducteur chez les fondatrices qui les portent. On s'attend à observer l'inverse si la variation phénotypique résulte d'un mécanisme de sélection naturelle. Dans les deux cas, ces processus accentueraient ces profils alaires au cours du temps, ce qui permet d'expliquer la rapidité de l'invasion et permettraient de prédire son accélération, comme cela a été le cas pour d'autres invasions de ce type (Phillips et al. 2006; Ochocki and Miller 2017).

La Corée du Sud a connu un scénario invasif comparable à l'Europe. Elle été envahie par le frelon asiatique à partir de la ville de Busan en 2003. Sa progression sur le territoire a été estimée entre 10 et 20 km/an et 7 ans après son arrivée, des nids à plus de 110 km de la zone d'introduction ont été identifiés (Choi et al. 2012). Son invasion a été rapide bien que de vitesse inférieure à celle de l'Europe, certainement à cause de la présence d'autres compétiteurs (autres espèces de *Vespa*) en Corée qui pourraient limiter sa progression (Choi et al. 2012). En 2015, le frelon asiatique a ensuite atteint le Japon continental (Takeuchi et al. 2017). A ma connaissance, aucune étude n'a encore quantifié sa vitesse d'expansion au Japon. Les populations françaises et coréennes invasives proviennent toutes deux de la même population de l'Est de la Chine (Arca et al. 2015). De plus, elles trouvent leurs origines dans un unique événement introductif par une fondatrice ou d'un nombre d'individus très restreint (Choi et al. 2013; Arca et al. 2015). De ce fait, par ces similitudes de *patterns* introductifs, nous pouvons supposer que les profils morphologiques que l'on retrouve dans les populations des fronts d'invasions européens (Chapitre 1) pourraient être présents sur les fronts d'invasions de la Corée du Sud et du Japon.

La différenciation morphologique que l'on a observée chez les frelons asiatiques suggère que l'invasion a pu s'accélérer depuis l'introduction du frelon asiatique en Europe et que ce phénomène continue d'opérer. Cependant, plus une espèce invasive se disperse vite, plus elle rencontre des environnements variés qui nécessitent une plus grande capacité d'adaptation (Duncan et al. 2003; Sol et al. 2007). Cela m'a amené à faire l'hypothèse que les frelons asiatiques possèdent une grande flexibilité

cognitive, ce qui prédisposerait l'espèce à des succès d'invasion. Pour identifier les comportements favorisant la dispersion des espèces invasives, de nombreuses études comparent leurs performances avec les espèces locales (Szabo et al. 2020). Dans mon cas, j'ai comparé la flexibilité cognitive du frelon asiatique (espèce invasive) avec celle du frelon européen (espèce établie) à l'aide de nouveaux dispositifs de tests cognitifs et en supposant que les frelons asiatiques auraient de meilleurs scores. Cependant, dans le cadre de mes expériences, je n'ai identifié aucune différence de flexibilité cognitive entre les deux espèces (Chapitre 2.1). En effet, les frelons des deux espèces apprennent à modifier rapidement leur apprentissage pour identifier une nouvelle ressource exploitable. La flexibilité comportementale englobe de nombreux comportements tels que la capacité à réaliser des inversions de consigne (*reversal learning*), à innover (*innovation*), à résoudre des problèmes (*problem-solving*) (Audet and Lefebvre 2017; Szabo et al. 2020). Ces différents comportements font appel à des compétences diverses et ne sont pas tous corrélés positivement (Audet and Lefebvre 2017). De ce fait, ici, nous avons testé la capacité d'inversion des consignes par les frelons (*reversal learning*) comme le résultat de l'expression de leur flexibilité comportementale. Cependant, leur haut potentiel invasif pourrait se distinguer par d'autres compétences telles que l'innovation face à l'exploitation de nouvelles ressources dans un environnement inconnu. Les performances des frelons pour ces différents aspects de la flexibilité cognitive restent à tester. Les nouveaux dispositifs de labyrinthes en Y que j'ai contribué à développer et à valider sont extrêmement prometteurs pour réaliser ce type d'expériences car ils permettent une grande variabilité de tests comportementaux, y compris en milieu naturel.

J'ai également fait l'hypothèse que le potentiel invasif du frelon asiatique était favorisé par son mode de vie social. En effet la socialité offre de nombreux avantages aux individus, propices à l'adaptation rapide à de nouveaux environnements (Moller 1996). Je me suis intéressée en particulier à l'utilisation d'information sociale dans le choix des sites de fourragement. Mes résultats montrent que les frelons s'attirent les uns entre les autres, probablement de manière passive par la vision ou l'odorat (Chapitre 2.2). Une des caractéristiques de l'interattraction sociale est qu'elle permet des décisions collectives qui peuvent être plus efficaces que les décisions individuelles (Lihoreau et al. 2017). Dans le

cas des frelons asiatiques, l'interattraction sur les sites pourrait favoriser leur accès direct aux ressources et entraîner des conséquences sur le développement de la colonie et de ce fait, favoriser leur dispersion. Ces comportements grégaires, bien connus chez les insectes, leur permettent une autre forme de flexibilité, en adaptant leurs cibles de fourragement en fonction de la présence de congénères. Bien que mes expériences aient été réalisées dans des pièges, et donc n'ont pas pu capter les dynamiques réelles d'agrégation de frelons sur les sources de nourriture en milieu naturel, mes analyses pilotes sur des frelons exploitant des assiettes de crevettes suggère que ces comportements collectifs sont naturellement exprimés dans les populations de frelons libres de tout mouvement (Chapitre 2, Figure 18). Il serait par conséquent intéressant de répéter ces expériences dans des situations de cafétéria dans lesquelles les groupes de frelons auraient le choix entre différentes sources de nourritures variant en qualité et quantité (Simpson and Raubenheimer 2012).

Ces comportements de fourragement semblent d'autant plus avantageux dans des environnements inconnus lorsque la population est peu dense et que les coûts associés à la recherche de nourriture sont élevés (Lihoreau et al. 2017). En effet, c'est le cas, par exemple chez le crapaud buffle ; les individus qui sont dans des populations moins denses, sont d'autant plus attirés les uns par les autres et bénéficient du transfert d'informations sociales (Gruber et al. 2017). Le succès d'établissement d'une espèce invasive dépend de la taille de la population (Britton and Gozlan 2013). De ce fait, aux fronts d'invasion, là où la densité de population est faible, le succès d'établissement devrait être limité. Dans le cas du frelon asiatique, nous pouvons supposer que plus cette interattraction est forte, plus elle est avantageuse lorsque la densité de population de l'espèce invasive est faible. Mes résultats suggèrent que l'attraction entre frelons est interspécifique, au minimum au sein du genre Vespa (ici, *Vespa velutina nigrithorax* et *Vespa crabro*). Le partage et l'utilisation d'informations sociales interspécifiques ont déjà été démontrés entre espèces qui exploitent les même ressources, par exemple pollinisateurs (Dawson and Chittka 2012; Avarguès-Weber et al. 2013). Aux fronts d'invasion, cette attraction entre plusieurs espèces pourrait être d'autant plus bénéfique puisque la densité de population de l'espèce invasive est faible.

2. *Vers une solution durable pour réduire la pression de prédation ?*

Les méthodes de luttes actuelles les plus utilisées contre le frelon asiatique telles que le piégeage et la destruction des nids, soulèvent des problèmes majeurs de sélectivité et/ou font face à la grande difficulté de localiser les nids. En effet, dans les zones où le frelon asiatique est établi depuis plusieurs années, les populations sont denses et le piégeage est globalement peu efficace (Monceau and Thiéry 2017) et peu sélectif puisqu'il entraîne la capture de nombreuses espèces non cibles (principalement des pollinisateurs appartenant aux Hyménoptères, Diptères et Lépidoptères) (Rojas-Nossa et al. 2018; Lioy et al. 2020). De plus, la destruction des nids de frelons coûte cher (23 millions d'euros en moins de 10 ans, Barbet-Massin et al. 2020) et passe par leur localisation qui reste difficile. De plus, la destruction de nids est réalisée avec des insecticides (ex : perméthrine), rémanents dans l'environnement et dangereux pour la biodiversité (Turchi and Derijard 2018). L'éradication de cette espèce déjà bien installée sur le territoire européen semble donc illusoire et coûteuse. Cependant, il est tout à fait possible de réguler les populations. Dans ce contexte, nous devons réfléchir à développer une approche plus efficace et plus respectueuse de l'environnement pour réduire la pression de prédation des frelons sur les ruchers. Une solution privilégiée serait de mener une lutte intégrée en utilisant les différents moyens de lutte modifiés et adaptés à l'écologie du frelon et à différents moments de son cycle de développement. Mes travaux de thèse permettent de proposer une amélioration concrète des solutions de piégeage existantes par le détournement de comportements naturels des frelons. Je propose également une nouvelle méthode de lutte biologique qui serait plus ciblée et plus respectueuse de l'environnement.

Ainsi, les processus d'agrégation des frelons dans un piège, démontrés dans le Chapitre 2.2, pourraient nous permettre, en amorçant les pièges avec des leurres de frelons asiatiques, d'augmenter leur efficacité. Puisque l'interattraction entre les individus semble interspécifique, cette solution pourrait stimuler le nombre de captures de frelons dans les pièges posés sur les ruchers.

Le frelon asiatique est proche phylogénétiquement du frelon européen (genre Vespa), ce qui nous permet de supposer que leurs proies communes (Cini et al. 2018) sont capables de reconnaître ces deux espèces de frelons (Banks and Dickman 2007). En effet, en Europe, les insectes proies semblent éviter le frelon asiatique puisque leur abondance diminue lorsqu'il est présent dans un environnement (Rojas-Nossa and Calviño-Cancela 2020a). Grâce aux amorces, le nombre de captures de frelons asiatiques dans ces pièges devraient augmenter très rapidement et nous pouvons supposer que leur présence serait détectable par les espèces non cibles qui éviteraient les pièges. En découle la question suivante : *A partir d'un nombre conséquent de prédateurs dans les pièges, les espèces non cibles cessent-elles de se faire piéger ?* Les piégeages amorcés pourraient améliorer la sélectivité des pièges en capturant directement en grand nombre les frelons. Pour le confirmer, il serait intéressant de connaître la dynamique de capture des espèces cibles et non cibles dans des pièges amorcés et de pouvoir quantifier l'interaction des captures entre des deux espèces.

En parallèle des pièges, mes résultats montrent qu'il est possible d'améliorer la détection des nids proches des ruchers pour les détruire grâce au système de radar millimétrique. Les radars harmoniques ou les systèmes de radio-télémétrie pour suivre les déplacements des frelons sont très chers (plusieurs dizaines voire centaines de milliers d'euros) et actuellement difficilement utilisables (Kennedy et al. 2018; Lioy et al. 2021b). Le système que j'ai proposé pendant ma thèse est peu coûteux (<5000 euros), simple d'utilisation (pas de capture, de manipulation ni de marquage des frelons) mais demande encore une importante phase de développement pour augmenter les distances de détection à plusieurs centaines de mètres (travaux en cours dans le cadre de la collaboration CRCA-CBI/LAAS-CNRS). Par exemple il est envisagé de développer des réseaux de radars ou de les monter sur des drones (possible par sa taille réduite, quelques cm) afin de localiser les nids. Malgré ces développements nécessaires, mes résultats suggèrent dès à présent que ce type de radars n'impacte pas le comportement des insectes, du moins celui des bourdons (Chapitre 3). Ces résultats sont encourageants et motivent la poursuite du développement de cette technologie de tracking. Des expériences sont en cours pour consolider ces résultats et les valider sur les frelons asiatiques

Cependant, à mon sens, à court terme, la solution la plus prometteuse pour réduire l'impact des frelons sur les ruchers et leurs effets néfastes sur la biodiversité est l'utilisation d'un entomopathogène pour détruire les nids. J'ai proposé le champignon *Metarhizium robertsii* puisqu'il impacte négativement la survie des frelons (Chapitre 4.1). Cependant, ces expériences ont été réalisées en laboratoire sur des frelons isolés et il reste à les valider en conditions naturelles. En effet de nombreuses espèces d'insectes sociaux possèdent des mécanismes de défense collective contre les parasites (Cremer et al. 2007). Certains de ces mécanismes peuvent avoir directement lieu dans le nid et d'autres, en dehors et agissent pour prévenir une infection. Par exemple, chez la fourmi *Lasius niger*, lorsque des individus de la colonie sont infectés par le champignon *Metarhizium brunneum*, le réseau social est réorganisé conduisant à l'exclusion des individus infectés et à leur maintien en marge du réseau d'interactions entre les individus (Stroeymeyt et al. 2018). Ces comportements peuvent limiter la propagation de l'infection dans la colonie. Dans un autre exemple, les fourmis *Myrmica rubra,* en fonction du stade infectieux que présente les proies disponibles dans leur environnement, sont capables de les ramener de manière différentielle à leur colonie (Pereira & Detrain, 2020). Ces comportements apparaissent comme préventifs et pourraient permettre de limiter l'introduction d'un parasite dans la colonie. Dans nos expériences, nous avons déjà observé des comportements de toilettage plus importants chez le frelon asiatique exposé aux spores de *M. robertsii* (Chapitre 4.2)*,* ce qui soulève la question de l'efficacité de ces comportements et de l'existence de potentiels mécanismes de défense à l'échelle coloniale.

Cette méthode de biocontrôle par champignon entomopathogène présenterait l'avantage d'avoir une action limitée sur les espèces non cibles, en fonction de la concentration à laquelle elles sont exposées (Chapitre 4.1 et 4.3). La concentration utilisée pour détruire les nids de frelons et le niveau de contamination interspécifique reste à établir et représente une étape cruciale pour la confirmation de l'efficacité de cette solution et sa non-dangerosité pour les non cibles. En effet, des études supplémentaires sont nécessaires pour quantifier les effets de ce pathogène sur les capacités de vol (distance parcourue, manœuvrabilité) et cognitif (apprentissages, mémoire) des frelons afin d'évaluer

le réel potentiel de contamination interspécifique. Pour cela, nous pourrions utiliser les nouveaux outils développés et validés au cours de cette thèse pour évaluer l'impact de *M. robertsii* sur : 1) le niveau de manœuvrabilité pendant le vol grâce au radar millimétrique (Chapitre 3), 2) l'apprentissage et la mémoire grâce au labyrinthe en Y (Chapitre 2). Il faudrait également évaluer, en cas d'infection interspécifique, la dose à laquelle l'individu non cible est exposé puisque ce paramètre est déterminant dans le niveau d'effets indésirables déclenchés. De plus, il faudrait évaluer le niveau de transmissibilité du pathogène dans une colonie d'insecte social. Si ce niveau reste très bas, alors nous pouvons supposer que les effets sur la biodiversité sont négligeables mais ces résultats seraient désavantageux pour la lutte contre le frelon.

Une autre option serait d'utiliser le champignon entomopathogène pour cibler les ouvrières de frelon fourrageuses. A terme, si nous parvenons à augmenter la sélectivité des pièges en détournant les processus d'agrégation des frelons, nous pourrions utiliser une méthode d'infection de type cheval de Troie. Par exemple, à la lumière de mes résultats, il est envisageable qu'un frelon attiré par des leurres (identifiés comme congénères) soit attiré dans un piège contenant un appât chargé de spores. Le frelon se nourrissant de cet appât s'infecterait et ramènerait le pathogène à la colonie. Le couvain, nourrit par les ouvrières, s'infecterait ainsi que les autres adultes en contact avec lui. En effet, l'avantage de l'utilisation d'un entomopathogène est le haut potentiel transmissible entre les individus d'une même colonie puisque les spores peuvent se disperser. Cependant, certaines espèces de fourmis (*Polyrhachis dives, Messor barbarus, Acromyrmex echinatior, Formica rufa*) ou de bourdons (*Bombus terrestris*) sont capables de détecter la présence d'un pathogène dans leur produits alimentaires ou sur leur site de fourragement et de les éviter (Fouks and Lattorff 2011; Tranter et al. 2015). Le niveau de développement de l'entomopathogène sur les produits alimentaires peut niveler le niveau d'évitement de ces produits par les fourrageurs, comme cela a été montré chez la fourmi *Myrmica rubra* exposés à des proies contaminées par *M. brunneum* (Pereira and Detrain 2020). Le comportement d'évitement des frelons vis-à-vis d'un produit alimentaire contaminé devra être établi pour envisager de diffuser *M. robertsii* par la méthode du cheval de Troie.

L'action combinée des piégeages plus efficaces dès juin, lorsque les colonies sont dans une phase fragile de développement ainsi qu'une destruction des nids à partir du mois d'août, avant l'émergence des premiers reproducteurs, pourrait significativement diminuer la pression de prédation des frelons sur les ruchers. Si nous arrivons à rendre les pièges spécifiques, alors nous pourrons envisager d'utiliser la méthode du cheval de Troie pour s'épargner de localiser les nids.

3. Apprendre à vivre avec les frelons

Bien que le développement de méthodes de luttes efficaces soit indispensable pour protéger l'apiculture, la destruction systématique des populations sur l'ensemble du territoire européen est illusoire. Il est par conséquent préférable d'apprendre à vivre avec le frelon asiatique puisqu'il est déjà bien installé. De plus, un nombre croissant de travaux suggère que sa présence dans nos écosystèmes pourrait apporter certains bénéfices. En effet, les guêpes assurent un rôle écosystémique en régulant les populations d'arthropodes et d'espèces nuisibles pour les cultures mais également en pollinisant et en participant à la reproduction d'espèce florales (Brock et al. 2021). A ma connaissance, seules deux études ont recensé une corrélation entre la présence de *V. velutina* dans un environnement et une diminution du service de pollinisation de deux espèces florales (*Metha suaveolens* et *H. hibernica)* (Rojas-Nossa and Calviño-Cancela 2020a; Rojas-Nossa et al. 2023). En effet, la présence du frelon asiatique perturbe la présence et le comportement de certains pollinisateurs (Rojas-Nossa and Calviño-Cancela 2020a). Cependant, des études récentes démontrent que le frelon asiatique pourrait agir lui-même comme pollinisateur : à la manière des abeilles, des butineuses de frelons ont été observées en train de visiter plusieurs plantes à fleurs de la même espèce au cours d'un seul trajet (Ueno 2015), pendant leurs déplacements de fleurs en fleurs, leur corps peut se retrouver recouvert de pollen (Ueno 2015) et elles sont capables d'apprendre et être fidèles à des stimuli visuels (Lacombrade et al. 2023), comme cela a été démontré chez une autre espèce de frelon (*Vespa tropica*) (Balamurali et al. 2021).

Les populations de pollinisateurs sont en déclin dans la majorité des régions du monde à cause des activités anthropiques (Goulson et al. 2015). Il me semble désormais intéressant d'évaluer le réel potentiel pollinisateur du frelon asiatique. Bien que nos expériences (Chapitre 2.1, Lacombrade et al. 2023) en laboratoire soulignent leur potentiel, il faudrait démontrer son existence en milieu naturel. Pour cela, il serait intéressant d'étudier le flux de pollen entre les différentes fleurs visitées par les frelons asiatiques et les comparer, à d'autres insectes pollinisateurs de ces plantes. De plus, par son proboscis plus court que celui de la majorité des abeilles (Krenn et al. 2005), le frelon asiatique ne pourrait visiter que des fleurs avec des corolles courtes et ouvertes, apportant potentiellement une complémentarité dans le service de pollinisation aux abeilles. Si l'important rôle pollinisateur des frelons est effectivement confirmé, alors cela permettrait d'encourager les recherches sur les méthodologies non léthales et de promouvoir leur utilisation par les apiculteurs. Il existe déjà une méthode de ce type, les muselières que les apiculteurs installent autour des ruches. Cette méthode permet de réduire l'impact des frelons sur l'activité générale des abeilles (Bonnefond et al. 2021) mais à ma connaissance, aucune étude ne démontre son efficacité à long terme. A mon sens, ce type de méthode est pourtant particulièrement intéressant par son concept. Afin d'évaluer l'intérêt de développer de telles méthodes non-létales (bénéficier au maximum du service de pollinisation rendu et les détourner des ruchers), il est indispensable d'évaluer leur impact global sur le service de pollinisation sauvage. En effet, la balance entre les coûts engendrés par son contrôle systématique et le service de pollinisation qu'il pourrait rendre sont à évaluer et à prendre en considération pour le développement de méthodes non-létales.

Des auteurs suggèrent que les guêpes invasives du genre *Vespula spp.* peuvent être économiquement bénéfiques dans les écosystèmes envahis puisqu'elles prédatent des mouches nuisibles et qu'elles auraient pourraient avoir un rôle pour limiter l'établissement et la dispersion d'autres espèces invasives (Lester and Beggs 2019). De la même façon, parmi la liste des proies du frelon asiatique figurent un Lépidoptère qui au stade juvénile peut causer des dégâts dans les cultures : *Lacanobia oleracea* (Rome et al. 2021). Bien que cette espèce ne représente pas la majorité de son régime alimentaire

(Villemant et al. 2011c; Rome et al. 2021), elle illustre la possibilité que la prédation du frelon asiatique puisse cibler des espèces ravageuses et de se fait bénéficier, au moins partiellement, à l'agriculture.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Depuis une dizaine d'années, le frelon asiatique suscite un intérêt croissant à fois dans le monde académique et auprès du grand public. Chaque année le nombre de publications sur cet insecte augmente (de 2005 à 2007 : de 0 à 1 étude, de 2020 à 2023 : de 22 à 27 études, résultat d'une recherche effectuée sur PubMed dans lesquels le terme *Vespa velutina* ou *Asian hornet* devait apparaître dans le titre ou le résumé de l'article). Au-delà de la nécessité d'augmenter les connaissances sur sa biologie pour développer des applications de biocontrôle (comme je l'ai discuté plus haut), le frelon asiatique constitue un modèle biologique très prometteur pour la recherche en éthologie, écologie et évolution. Les frelons, et notamment le frelon asiatique, par la grande complexité de son organisation sociale et son haut succès écologique, sont en passe de devenir un nouveau modèle d'étude particulièrement intéressant pour approcher des questions faisant l'interface entre socialité et succès écologique. En effet, ces frelons forment de grandes colonies (plusieurs milliers d'individus) ayant des besoins variables en sucres et en protéines et sur un temps très court de l'année (échelle de la saison). Pour combler les besoins de la colonie, les frelons ont des fourrageurs qui vont faire face à des problèmes aux enjeux très différents pour collecter des proies et du nectar. La nutrition des frelons est également complexe puisqu'elle repose aussi sur une alimentation bidirectionnelle entre les adultes et le couvain (Bodner et al. 2021; Bouchebti et al. 2022). Les larves qui sont nourries par les adultes, régurgitent des produits riches en enzymes digestives qui sont ingérés par les adultes et favorisent leur digestion (Sorensen et al. 1983; Meurville and LeBoeuf 2021). Il y a également tout un échange du nectar entre les adultes et le couvain qui pourrait permettre la cohésion sociale du groupe (Bouchebti et al. 2022). Cet insecte est robuste. Il peut être conservé en laboratoire (Lacombrade et al. 2023), en milieu semi-naturel (Poidatz 2017), l'ensemble de son cycle de vie est reproductible en laboratoire (Van Itterbeeck et al. 2021), l'administration de traitement et sa manipulation est facile (Chapitre 2 et 4) et des expériences en milieu naturel sont envisageables (observations personnelles : nous avons réussi à lui apprendre à fourrager sur des feeders artificiels dans un champ). Pour toutes ces raisons, je crois que le frelon asiatique est un excellent modèle biologique en devenir, pour répondre à la fois à des questions fondamentales et appliquées et à la frontière entre socialité et écologie.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott J (2014) Self-medication in insects: current evidence and future perspectives. Ecol Entomol 39:273–280. https://doi.org/10.1111/een.12110

Acheampong MA, Hill MP, Moore SD, Coombes CA (2020) UV sensitivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates under investigation as potential biological control agents in South African citrus orchards. Fungal Biol 124:304–310. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.08.009

Adamo SA, Fidler TL, Forestell CA (2007) Illness-induced anorexia and its possible function in the caterpillar, *Manduca sexta*. Brain Behav Immun 21:292–300

Agostini N, Panuccio M, Pasquaretta C (2015) Morphology, flight performance, and water crossing tendencies of Afro-Palearctic raptors during migration. Curr Zool 61:951–958. https://doi.org/10.1093/czoolo/61.6.951

Alghamdi A, Dalton L, Phillis A, et al (2008) Immune response impairs learning in free-flying bumblebees. Biol Lett 4:479–481. https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0331

Amiri B, Ibrahim L, Butt TM (1999) Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. Biocontrol Sci Technol 9:487–498. https://doi.org/10.1080/09583159929451

Angelone S, Bidochka MJ (2018) Diversity and abundance of entomopathogenic fungi at ant colonies. J Invertebr Pathol 156:73–76. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.009

ANSES (2013) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, et de l'environnement et du travail relatif à la demande de dérogation du titre de l'article 15 de la Directive 98/8/CE pour l'utilisation du dioxyde de soufre (SO2) en France pour un usage antiparasitaire.

Antoine H (2011) Le biocontrôle pour la protection des cultures

Arca M, Mougel F, Guillemaud T, et al (2015) Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, in Europe. Biol Invasions 17:2357–2371. https://doi.org/10.1007/s10530-015-0880-9

Archer ME (2010) The queen colony phase of vespine wasps (Hymenoptera, Vespidae). Insectes Sociaux 57:133–145. https://doi.org/10.1007/s00040-009-0063-8

Arthurs S, Thomas MB (2001) Behavioural changes in *Schistocerca gregaria* following infection with a fungal pathogen: implications for susceptibility to predation. Ecol Entomol 26:227–234. https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00317.x

Audet J-N, Lefebvre L (2017) What's flexible in behavioral flexibility? Behav Ecol 28:943–947. https://doi.org/10.1093/beheco/arx007

Avarguès-Weber A, d'Amaro D, Metzler M, et al (2018) Does holistic processing require a large brain? Insights from honeybees and wasps in fine visual recognition tasks. Front Psychol 9:1313. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.01313

Avarguès-Weber A, Dawson EH, Chittka L (2013) Mechanisms of social learning across species boundaries. J Zool 290:1–11. https://doi.org/10.1111/jzo.12015

Avarguès-Weber A, Deisig N, Giurfa M (2011) Visual cognition in social insects. Annu Rev Entomol 56:423–443. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144855

Aw KMS, Hue SM (2017) Mode of infection of *Metarhizium spp.* fungus and their potential as biological control agents. J Fungi 3:30. https://doi.org/10.3390/jof3020030

Baer B, Schmid-Hempel P (2003) Bumblebee workers from different sire groups vary in susceptibility to parasite infection. Ecol Lett 6:106–110. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00411.x

Baer B, Schmid-Hempel P (1999) Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. Nature 397:151–154

Balamurali GS, Reshnuraj RS, Johnson J, et al (2021) Visual associative learning and olfactory preferences of the greater banded hornet, *Vespa tropica*. Insectes Sociaux 68:217–226. https://doi.org/10.1007/s00040-021-00820-w

Ball BV, Pye BJ, Carreck NL, et al (1994) Laboratory testing of a mycopesticide on non-target organisms: the effects of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* applied to *Apis mellifera*. Biocontrol Sci Technol 4:289–296. https://doi.org/10.1080/09583159409355337

Banks PB, Dickman CR (2007) Alien predation and the effects of multiple levels of prey naiveté. Trends Ecol Evol 22:229–230. https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.02.006

Baracchi D, Brown MJF, Chittka L (2015a) Behavioural evidence for self-medication in bumblebees? F1000Research 4:73. https://doi.org/10.12688/f1000research.6262.3

Baracchi D, Dapporto L, Turillazzi S (2011) Relevance of wing morphology in distinguishing and classifying genera and species of Stenogastrinae wasps. Contrib Zool 80:191–199. https://doi.org/10.1163/18759866-08003003

Baracchi D, Petrocelli I, Chittka L, et al (2015b) Speed and accuracy in nest-mate recognition: a hover wasp prioritizes face recognition over colony odour cues to minimize intrusion by outsiders. Proc R Soc B Biol Sci 282:20142750. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2750

Baracchi D, Vasas V, Jamshed Iqbal S, Alem S (2018) Foraging bumblebees use social cues more when the task is difficult. Behav Ecol 29:186–192. https://doi.org/10.1093/beheco/arx143

Barbet-Massin M, Rome Q, Muller F, et al (2013) Climate change increases the risk of invasion by the Yellow-legged hornet. Biol Conserv 157:4–10. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.09.015

Barbet-Massin M, Salles J-M, Courchamp F (2020) The economic cost of control of the invasive yellow-legged Asian hornet. NeoBiota 55:11–25. https://doi.org/10.3897/neobiota.55.38550

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. J Stat Softw 1–48

Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ (2012) Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. Science 336:1576–1577. https://doi.org/10.1126/science.1222289

Beier WV, Menzel R (1972) Untersuchungen über den farbensinn der deutschen wespe (*Paravespula germanica F.*, Hymenoptera, Vespidae): Verhaltensphysiologischer nachweis des farbensehens. Zool Jb Physiol 76:441–454

Bellard C, Thuiller W, Leroy B, et al (2013) Will climate change promote future invasions? Glob Change Biol 19:3740–3748. https://doi.org/10.1111/gcb.12344

Bérénos C, Schmid-Hempel P, Mathias Wegner K (2009) Evolution of host resistance and trade-offs between virulence and transmission potential in an obligately killing parasite. J Evol Biol 22:2049–2056. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01821.x

Bertelsmeier C (2021) Globalization and the anthropogenic spread of invasive social insects. Curr Opin Insect Sci 46:16–23. https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.01.006

Bessa AS, Carvalho J, Gomes A, Santarém F (2016) Climate and land-use drivers of invasion: Predicting the expansion of *Vespa velutina nigrithorax* into the Iberian Peninsula. Insect Conserv Divers 9:27–37. https://doi.org/10.1111/icad.12140

Bhat SS, Sheridan J, Hourigan K, Thompson MC (2019) Aspect ratio studies on insect wings. Phys Fluids 31:

Blackburn TM, Pyšek P, Bacher S, et al (2011) A proposed unified framework for biological invasions. Trends Ecol Evol 26:333–339. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023

Bodner L, Bouchebti S, Levin E (2021) Allocation and metabolism of naturally occurring dietary amino acids in the Oriental hornet. Insect Biochem Mol Biol 139:103675. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103675

Bonnefond L, Paute S, Andalo C (2021) Testing muzzle and ploy devices to reduce predation of bees by Asian hornets. J Appl Entomol 145:145–157. https://doi.org/10.1111/jen.12808

Bose T, Reina A, Marshall JA (2017) Collective decision-making. Curr Opin Behav Sci 16:30–34. https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.03.004

Bouchebti S, Bodner L, Levin E (2022) Continuous exchange of nectar nutrients in an Oriental hornet colony. Commun Biol 5:1112. https://doi.org/10.1038/s42003-022-04095-0

Bradley BA, Blumenthal DM, Early R, et al (2012) Global change, global trade, and the next wave of plant invasions. Front Ecol Environ 10:20–28. https://doi.org/10.1890/110145

Britton JR, Gozlan RE (2013) How many founders for a biological invasion? Predicting introduction outcomes from propagule pressure. Ecology 94:2558–2566. https://doi.org/10.1890/13-0527.1

Brock RE, Cini A, Sumner S (2021) Ecosystem services provided by aculeate wasps. Biol Rev 96:1645–1675. https://doi.org/10.1111/brv.12719

Brown GP, Shilton C, Phillips BL, Shine R (2007) Invasion, stress, and spinal arthritis in cane toads. Proc Natl Acad Sci 104:17698–17700. https://doi.org/10.1073/pnas.0705057104

Brown MJF, Loosli R, Schmid-Hempel P (2000) Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. Oikos 91:421–427. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.910302.x

Brunner-Mendoza C, Reyes-Montes M del R, Moonjely S, et al (2019) A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. Biocontrol Sci Technol 29:83–102. https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1531111

Buatois A, Pichot C, Schultheiss P, et al (2017) Associative visual learning by tethered bees in a controlled visual environment. Sci Rep 7:12903. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12631-w

Budge GE, Hodgetts J, Jones EP, et al (2017) The invasion, provenance and diversity of *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae) in Great Britain. PLOS ONE 12:e0185172. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185172

Cabirol A, Cope AJ, Barron AB, Devaud J-M (2018) Relationship between brain plasticity, learning and foraging performance in honey bees. PLOS ONE 13:e0196749. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196749

Carisio L, Cerri J, Lioy S, et al (2022) Impacts of the invasive hornet *Vespa velutina* on native wasp species: a first effort to understand population-level effects in an invaded area of Europe. J Insect Conserv. https://doi.org/10.1007/s10841-022-00405-3

Carlesso D, Smargiassi S, Sassoli L, et al (2020) Exposure to a biopesticide interferes with sucrose responsiveness and learning in honey bees. Sci Rep 10:19929. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76852-2

Cepero LC, Rosenwald LC, Weiss MR (2015) The relative importance of flower color and shape for the foraging monarch butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae). J Insect Behav 28:499–511. https://doi.org/10.1007/s10905-015-9519-z

Cervo R, Zacchi F, Turillazzi S (2000) *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) invading North America: some hypotheses for its rapid spread: Insectes Sociaux 47:155–157. https://doi.org/10.1007/PL00001694

Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, et al (2000) Consequences of changing biodiversity. Nature 405:234–242. https://doi.org/10.1038/35012241

Chapman RE, Bourke EFG (2008) The influence of sociality on the conservation biology of social insects.

Ecology Letters 4,6:650-662.

Chapple DG, Simmonds SM, Wong BBM (2012) Can behavioral and personality traits influence the success of unintentional species introductions? Trends Ecol Evol 27:57–64. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.09.010

Cheng Y-N, Wen P, Tan K, Darrouzet É (2022) Designing a sex pheromone blend for attracting the yellow-legged hornet (*Vespa velutina*), a pest in its native and invasive ranges worldwide. Entomol Gen. https://doi.org/10.1127/entomologia/2022/1395

Chittka L, Raine NE (2006) Recognition of flowers by pollinators. Curr Opin Plant Biol 9:428–435. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.002

Chittka L, Thomson JD (2001) Cognitive Ecology of Pollination: Animal Behaviour and Floral Evolution. Cambridge University Press

Chittka L, Thomson JD, Waser NM (1999) Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. Naturwissenschaften 86:361–377. https://doi.org/10.1007/s001140050636

Choi MB (2021) Defensive behavior of the invasive alien hornet *Vespa velutina nigrithorax* against potential human aggressors. Entomol Res 51:186–195. https://doi.org/10.1111/1748-5967.12514

Choi MB, Lee S-A, Suk HY, Lee JW (2013) Microsatellite variation in colonizing populations of yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina nigrithorax* , in South Korea: Genetic variation of *Vespa velutina*. Entomol Res 43:208–214. https://doi.org/10.1111/1748-5967.12027

Choi MB, Martin SJ, Lee JW (2012) Distribution, spread, and impact of the invasive hornet *Vespa velutina* in South Korea. J Asia-Pac Entomol 15:473–477. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2011.11.004

Cini A, Cappa F, Petrocelli I, et al (2018) Competition between the native and the introduced hornets *Vespa crabro* and *Vespa velutina*: a comparison of potentially relevant life-history traits. Ecol Entomol

Clancy LM, Jones R, Cooper AL, et al (2018) Dose-dependent behavioural fever responses in desert locusts challenged with the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. Sci Rep 8:14222. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32524-w

Clarke D, Whitney H, Sutton G, Robert D (2013) Detection and learning of floral electric fields by bumblebees. Science 340:66–69. https://doi.org/10.1126/science.1230883

Clifton EH, Cortell J, Ye L, et al (2019) Impacts of *Metarhizium brunneum* F52 infection on the flight performance of Asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. PLOS ONE 14:e0221997. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221997

Cohen AC (2015) Insect Diets: Science and Technology, Second Edition. CRC Press

Collett TS, Collett M (2002) Memory use in insect visual navigation. Nat Rev Neurosci 3:542–552. https://doi.org/10.1038/nrn872

Conroy TJ, Palmer-Young EC, Irwin RE, Adler LS (2016) Food Limitation Affects Parasite Load and Survival of *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) Infected With Crithidia (Trypanosomatida: Trypanosomatidae). Environ Entomol 45:1212–1219. https://doi.org/10.1093/ee/nvw099

Cornell SJ, Tregenza T (2007) A new theory for the evolution of polyandry as a means of inbreeding avoidance. Proc R Soc B Biol Sci 274:2873–2879. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0926

Costa JT (2018) The other insect societies: overview and new directions. Curr Opin Insect Sci 28:40–49. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.008

Couto A, Monceau K, Bonnard O, et al (2014) Olfactory Attraction of the Hornet *Vespa velutina* to Honeybee Colony Odors and Pheromones. PLOS ONE 9:e115943. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115943

Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P (2007) Social Immunity. Curr Biol 17:R693–R702. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008

Culliney TW (2014) Crop Losses to Arthropods. In: Pimentel D, Peshin R (eds) Integrated Pest Management: Pesticide Problems, Vol.3. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 201–225

Cwynar LC, MacDonald GM Geographical variation of lodgepole pine in relation to population history. Am Nat 129:

D'Adamo P, Lozada M (2011) Cognitive plasticity in foraging *Vespula germanica* wasps. J Insect Sci 11:103

D'adamo P, Lozada M (2003) The importance of location and visual cues during foraging in the German wasp (Vespula germanica F.) (Hymenoptera: Vespidae). N Z J Zool 30:171–174. https://doi.org/10.1080/03014223.2003.9518336

D'adamo P, Lozada M, Corley J (2003) Conspecifics enhance attraction of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) foragers to food baits. Ann Entomol Soc Am 96:685–688. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2003)096[0685:CEAOVG]2.0.CO;2

Davidson AM, Jennions M, Nicotra AB (2011) Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? a meta-analysis: Invasive species have higher phenotypic plasticity. Ecol Lett 14:419–431. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01596.x

Davis HE, Meconcelli S, Radek R, McMahon DP (2018) Termites shape their collective behavioural response based on stage of infection. Sci Rep 8:14433. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32721-7

Dawson EH, Chittka L (2012) Conspecific and heterospecific information use in bumblebees. PLOS ONE 7:e31444. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031444

de Haro L, Labadie M, Chanseau P, et al (2010) Medical consequences of the Asian black hornet (*Vespa velutina*) invasion in Southwestern France. Toxicon 55:650–652. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.005

Deacon AE, Ramnarine IW, Magurran AE (2011) How reproductive ecology contributes to the spread of a globally invasive fish. PLoS ONE 6:e24416. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024416

DeBach P, Rosen D, Kennett E (1971) Biological control of coccids by introduced natural enemies. Biol Control 165–194

Dedic E, Hadj Djilani A, Henry D, et al (2023) 3D Tracking of small moving targets in cluttered environment from the isolines processing of millimeter-wave radar images. Potland, Oregon, USA

Demichelis S, Manino A, Porporato M (2014) Social wasp trapping in north west Italy: comparison of different bait-traps and first detection of *Vespa velutina*. Bull Insectology 67:307–317

Deneubourg JL, Goss S (1989) Collective patterns and decision-making. Ethol Ecol Evol 1:295–311. https://doi.org/10.1080/08927014.1989.9525500

Detrain C, Deneubourg J-L (2008) Collective Decision-Making and Foraging Patterns in Ants and Honeybees. In: Simpson SJ (ed) Advances in Insect Physiology. Academic Press, pp 123–173

Dillane E, Hayden R, O'Hanlon A, et al (2022) The first recorded occurrence of the Asian hornet (*Vespa velutina*) in Ireland, genetic evidence for a continued single invasion across Europe. J Hymenopt Res 93:131–138. https://doi.org/10.3897/jhr.93.91209

Dimbi S, Maniania NK, Ekesi S (2013) Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* in fruit flies and effect of fungal infection on egg laying and fertility. Insects 4:206–216. https://doi.org/10.3390/insects4020206

Dominique P (2014) Pesticides et agro-écologie, les champs du possible

Dore A, Henry D, Lihoreau M, Aubert H (2020) 3D trajectories of multiple untagged flying insects from millimetre-wave beamscanning radar. In: 2020 IEEE International Symposium on Antennas and Propagation and North American Radio Science Meeting. pp 1209–1210

Dore A, Lihoreau M, Henry D, Aubert H (2022) How do bees move across the landscapes? Proj Repos J 12:76–79

Douglas AE (2015) Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. Annu Rev Entomol 60:17–34. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822

Duncan RP, Blackburn TM, Sol D (2003) The ecology of bird introductions. Annu Rev Ecol Evol Syst 34:71–98. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132353

Dunlap AS, Nielsen ME, Dornhaus A, Papaj DR (2016) Foraging bumble bees weigh the reliability of personal and social information. Curr Biol 26:1195–1199. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.009

Dussutour A, Simpson SJ, Despland E, Colasurdo N (2007) When the group denies individual nutritional wisdom. Anim Behav 74:931–939. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.12.022

Dvorak L (2006) Oriental hornet *Vespa orientalis* Linnaeus 1771 found in Mexico (Hymenoptera, Vespidae, Vespinae). Entomol Probl 36:80

Dyer AG, Chittka L (2004) Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. Naturwissenschaften 91:224–227. https://doi.org/10.1007/s00114-004-0508-x

Ekesi S, Maniania NK (2000) Susceptibility of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. Entomol Exp Appl

Elliot, Sabelis, Janssen, et al (2000) Can plants use entomopathogens as bodyguards? Ecol Lett 3:228–235. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00137.x

Eyer P-A, Vargo EL (2021) Breeding structure and invasiveness in social insects. Curr Opin Insect Sci 46:24–30. https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.01.004

Felippotti GT, Mateus L, Mateus S, et al (2010) Morphological caste differences in three species of the neotropical Genus *Clypearia* (Hymenoptera: Polistinae: Epiponini). Psyche J Entomol 2010:1–8. https://doi.org/10.1155/2010/410280

Fouks B, Lattorff HMG (2011) Recognition and avoidance of contaminated flowers by foraging bumblebees (*Bombus terrestris*). PLOS ONE 6:e26328. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026328

Fox J, Weisberg S (2018) Visualizing fit and lack of fit in complex regression models with predictor effect plots and partial residuals. J Stat Softw 87:1–27. https://doi.org/10.18637/jss.v087.i09

Fox J, Weisberg S (2019) An R companion to applied regression, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA

Fry SN, Bichsel M, Müller P, Robert D (2000) Tracking of flying insects using pan-tilt cameras. J Neurosci Methods 101:59–67. https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00253-3

Gambino P, Medeiros AC, Loope LL (1990) Invasion and colonization of upper elevations on East Maui (Hawaii) by *Vespula pensylvanica* (Hymenoptera: Vespidae). Ann Entomol Soc Am 83:1088–1095. https://doi.org/10.1093/aesa/83.6.1088

Gegear RJ, Otterstatter MC, Thomson JD (2006) Bumble-bee foragers infected by a gut parasite have an impaired ability to utilize floral information. Proc R Soc B Biol Sci 273:1073–1078. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3423

Gegear RJ, Thomson JD (2004) Does the flower constancy of bumble bees reflect foraging economics? Ethology 110:793–805. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2004.01010.x

Geng H, Lafon G, Avarguès-Weber A, et al (2022) Visual learning in a virtual reality environment upregulates immediate early gene expression in the mushroom bodies of honey bees. Commun Biol 5:1–11. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03075-8

Gill RJ, Baldock KCR, Brown MJF, et al (2016) Protecting an ecosystem service: approaches to understanding and mitigating threats to wild insect pollinators. In: Woodward G, Bohan DA (eds) Advances in Ecological Research. Academic Press, pp 135–206

Giraldeau L-A, Caraco T (2000) Social Foraging Theory. Princeton University Press

Giurfa M (2007) Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. J Comp Physiol A 193:801–824. https://doi.org/10.1007/s00359-007-0235-9

Giurfa M (2004) Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. Naturwissenschaften 91:228–231. https://doi.org/10.1007/s00114-004-0530-z

Giurfa M, Hammer M, Stach S, et al (1999) Pattern learning by honeybees: conditioning procedure and recognition strategy. Anim Behav 57:315–324. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0957

Gómez-Moracho T, Durand T, Lihoreau M (2022) The gut parasite *Nosema ceranae* impairs olfactory learning in bumblebees. J Exp Biol 225:jeb244340. https://doi.org/10.1242/jeb.244340

Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347:1255957–1255957. https://doi.org/10.1126/science.1255957

Goulson D, Stout JC (2001) Homing ability of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). Apidologie 32:105–111. https://doi.org/10.1051/apido:2001115

Goulson D, Stout JC, Langley J, Hughes WOH (2000) Identity and function of scent marks deposited by foraging bumblebees. J Chem Ecol 26:2897–2911. https://doi.org/10.1023/A:1026406330348

Grassé PP (1952) Le fait social : Ses critères biologiques, ses limites. In: Structure et physiologie des sociétés animales, P.P. Grassé. Paris, pp 7–17

Graystock P, Goulson D, Hughes WOH (2015) Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. Proc R Soc B Biol Sci 282:20151371. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1371

Greggers U, Koch G, Schmidt V, et al (2013) Reception and learning of electric fields in bees. Proc R Soc B Biol Sci 280:20130528. https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0528

Grosso-Silva JM, Maia M *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Vespidae), new species for Portugal. 2

Gruber J, Whiting MJ, Brown G, Shine R (2017) The loneliness of the long-distance toad: invasion history and social attraction in cane toads (*Rhinella marina*). Biol Lett 13:20170445. https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0445

Grüter C, Jongepier E, Foitzik S (2018) Insect societies fight back: the evolution of defensive traits against social parasites. Philos Trans R Soc B Biol Sci 373:20170200. https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0200

Hajek AE, St. Leger RJ (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu Rev Entomol 39:293–322. https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453

Hassan A, Huang Q, Mehmood N, et al (2021) Alteration of termite locomotion and allogrooming in response to infection by pathogenic fungi. J Econ Entomol 114:1256–1263. https://doi.org/10.1093/jee/toab071

Haubrock PJ, Turbelin AJ, Cuthbert RN, et al (2021) Economic costs of invasive alien species across Europe. NeoBiota 67:153–190. https://doi.org/10.3897/neobiota.67.58196

Haxaire J, Tamisier J-P, Bouguet J-P (2006) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hym., Vespidae). Bull Société Entomol Fr 111:194–194. https://doi.org/10.3406/bsef.2006.16309

Healy S, Hurly T (2003) Cognitive ecology: foraging in hummingbirds as a model system. In: Advances in the Study of Behavior. Elsevier, pp 325–359

Howard SR, Avarguès-Weber A, Garcia JE, et al (2019) Numerical cognition in honeybees enables addition and subtraction. Sci Adv 5:eaav0961. https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0961

Hughes CL, Dytham C, Hill JK (2007) Modelling and analysing evolution of dispersal in populations at expanding range boundaries. Ecol Entomol 32:437–445. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2007.00890.x

Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. J Appl Ecol 46:10–18. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x

Hulme PE (2021) Unwelcome exchange: International trade as a direct and indirect driver of biological invasions worldwide. One Earth 4:666–679. https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.04.015

Hunt JH (2007) The evolution of social wasps. Oxford University Press

Inglis GD, Duke GM, Kawchuk LM, Goettel MS (1999) Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. Biol Control 14:111–120. https://doi.org/10.1006/bcon.1998.0666

Inglis GD, Ivie TJ, Duke GM, Goettel MS (2000) Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and colorado potato beetle larvae. Biol Control 18:55–64. https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0806

Jahant-Miller C, Miller R, Parry D (2022) Size-dependent flight capacity and propensity in a range-expanding invasive insect. Insect Sci 29:879–888. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12950

Janet C (1895) Etudes sur les fourmis, les guêpes et les abeilles. Note 9: sur *Vespa crabro* L. Histoire d'un nid depuis son origine. Mém Société Zool Fr 8:1–140

Jeanson R, Dussutour A, Fourcassié V (2012) Key factors for the emergence of collective decision in invertebrates. Front Neurosci 6:

Kanga LHB, Jones WA, James RR (2003) Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. J Econ Entomol 96:

Kapongo JP, Shipp L, Kevan P, Sutton JC (2008) Co-vectoring of Beauveria bassiana and Clonostachys rosea by bumble bees (*Bombus impatiens*) for control of insect pests and suppression of grey mould in greenhouse tomato and sweet pepper. Biol Control 46:508–514. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.05.008

Kasper ML, Reeson AF, Mackay DA, Austin AD (2008) Environmental factors influencing daily foraging activity of *Vespula germanica* (Hymenoptera, Vespidae) in Mediterranean Australia. Insectes Sociaux 55:288–295. https://doi.org/10.1007/s00040-008-1004-7

Kawaguchi LG, Ohashi K, Toquenaga Y (2006) Do bumble bees save time when choosing novel flowers by following conspecifics? Funct Ecol 20:239–244. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01086.x

Kennedy PJ, Ford SM, Poidatz J, et al (2018) Searching for nests of the invasive Asian hornet (*Vespa velutina*) using radio-telemetry. Commun Biol 1:. https://doi.org/10.1038/s42003-018-0092-9

Kerlinger P (1985) Water-crossing behavior of raptors during migration. Wilson Bull 97:109–113

Khun KK, Ash GJ, Stevens MM, et al (2021) Transmission of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to adults of *Kuschelorhynchus macadamiae* (Coleoptera: Curculionidae) from infected adults and conidiated cadavers. Sci Rep 11:2188. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81647-0

Kim J-K, Choi M, Moon T-Y (2006) Occurrence of *Vespa velutina* Lepeletier from Korea, and a revised key for Korean Vespa species (Hymenoptera: Vespidae). Entomol Res 36:112–115. https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2006.00018.x

Klingner R, Richter K, Schmolz E (2006) Strategies of social wasps for thermal homeostasis in light paper nests. J Therm Biol 31:599–604. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2006.08.005

Klingner R, Richter K, Schmolz E, Keller B (2005) The role of moisture in the nest thermoregulation of social wasps. Naturwissenschaften 92:427–430. https://doi.org/10.1007/s00114-005-0012-y

Koch H, Woodward J, Langat MK, et al (2019) Flagellum removal by a nectar metabolite inhibits infectivity of a bumblebee parasite. Curr Biol 29:3494-3500.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.037

Koch RL (2003) Multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. J Insect Sci 3:

Kohlmeier P, Holländer K, Meunier J (2016) Survival after pathogen exposure in group-living insects: don't forget the stress of social isolation! J Evol Biol 29:1867–1872. https://doi.org/10.1111/jeb.12916

Kovacs JL, Goodisman MAD (2012) Effects of size, shape, Genotype, and mating status on queen overwintering survival in the social wasp *Vespula maculifrons*. Environ Entomol 41:1612–1620. https://doi.org/10.1603/EN12023

Kovacs JL, Hoffman EA, Marriner SM, et al (2010) Environmental and genetic influences on queen and worker body size in the social wasp *Vespula maculifrons*. Insectes Sociaux 57:53–65. https://doi.org/10.1007/s00040-009-0050-0

Kraus S (2022) Influence du contexte social et environnemental sur la nutrition des bourdons. Université de Toulouse

Kraus S, Gómez-Moracho T, Pasquaretta C, et al (2019) Bumblebees adjust protein and lipid collection rules to the presence of brood. Curr Zool 65:437–446. https://doi.org/10.1093/cz/zoz026

Krause J, Ruxton GD (2002) Living in groups, Oxford University Press. New York

Krenn HW, Plant JD, Szucsich NU (2005) Mouthparts of flower-visiting insects. Arthropod Struct Dev 34:1–40. https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.10.002

Kryukov V, Yaroslavtseva O, Tyurin M, et al (2017) Ecological preferences of *Metarhizium spp.* from Russia and neighboring territories and their activity against Colorado potato beetle larvae. J Invertebr Pathol 149:1–7. https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.07.001

Kyriazakis I, Tolkamp BJ, Hutchings MR (1998) Towards a functional explanation for the occurrence of anorexia during parasitic infections. Anim Behav 56:265–274. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0761

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, et al (2015) Insect pathogens as biological control agents: back to the future. J Invertebr Pathol 132:1–41. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009

Lacombrade M, Doblas-Bajo M, Rocher N, et al (2023) Flexible visual learning in nectar-foraging hornets. Behav Ecol Sociobiol 77:76. https://doi.org/10.1007/s00265-023-03349-z

Laurino D, Lioy S, Carisio L, et al (2019) *Vespa velutina*: an alien driver of honey bee colony losses. Diversity 12:5. https://doi.org/10.3390/d12010005

Leadbeater E, Chittka L (2009) Social information use in foraging insects. In: Food Exploitation By Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches. CRC Press

Lemanski NJ, Cook CN, Smith BH, Pinter-Wollman N (2019) A multiscale review of behavioral variation in collective foraging behavior in honey bees. Insects 10:370. https://doi.org/10.3390/insects10110370

Léotard G, Debout G, Dalecky A, et al (2009) Range expansion drives dispersal evolution in an equatorial three-species symbiosis. PLoS ONE 4:e5377. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005377

Lester PJ, Beggs JR (2019) Invasion success and management strategies for social *Vespula* wasps. Annu Rev Entomol 64:51–71. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111812

Lewis RC, Pointer MD, Friend LA, et al (2020) Polyandry provides reproductive and genetic benefits in colonising populations. Ecol Evol 10:10851–10857. https://doi.org/10.1002/ece3.6742

Leza M, Herrera C, Marques A, et al (2019) The impact of the invasive species *Vespa velutina* on honeybees: a new approach based on oxidative stress. Sci Total Environ 689:709–715. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.511

Liebman M (1996) Polyculture cropping systems. In: Agroecology, 2nd edn. CRC Press

Lihoreau M, Charleston MA, Senior AM, et al (2017) Collective foraging in spatially complex nutritional environments. Philos Trans R Soc B Biol Sci 372:20160238. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0238

Lihoreau M, Deneubourg J-L, Rivault C (2010) Collective foraging decision in a gregarious insect. Behav Ecol Sociobiol 64:1577–1587. https://doi.org/10.1007/s00265-010-0971-7

Lihoreau M, Gómez-Moracho T, Pasquaretta C, et al (2018) Social nutrition: an emerging field in insect science. Curr Opin Insect Sci 28:73–80. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.003

Lihoreau M, Raine NE, Reynolds AM, et al (2012) Radar tracking and motion-sensitive cameras on flowers reveal the development of pollinator multi-destination routes over large spatial scales. PLoS Biol 10:e1001392. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001392

Lioni A, Sauwens C, Theraulaz G, Deneubourg J-L (2001) Chain formation in *Œcophylla longinoda*. J Insect Behav 14:679–696. https://doi.org/10.1023/A:1012283403138

Lioy S, Bianchi E, Biglia A, et al (2021a) Viability of thermal imaging in detecting nests of the invasive hornet *Vespa velutina*. Insect Sci 28:271–277. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12760

Lioy S, Laurino D, Capello M, et al (2020) Effectiveness and selectiveness of traps and baits for catching the invasive hornet *Vespa velutina*. Insects 11:706. https://doi.org/10.3390/insects11100706

Lioy S, Laurino D, Maggiora R, et al (2021b) Tracking the invasive hornet *Vespa velutina* in complex environments by means of a harmonic radar. Sci Rep 11:12143. https://doi.org/10.1038/s41598-021-91541-4

López S, González M, Goldarazena A (2011) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae): first records in Iberian Peninsula. EPPO Bull 41:439–441. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2011.02513.x

Lozada M, Adamo PD, Buteler M, Kuperman MN (2016) Social learning in *Vespula Germanica* wasps: so they use collective foraging strategies? PLOS ONE 11:e0152080. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152080

Macfarlane RP, Lipa JJ, Liu HJ (1995) Bumble bee pathogens and internal enemies. Bee World 76:130–148. https://doi.org/10.1080/0005772X.1995.11099259

Maggiora R, Saccani M, Milanesio D, Porporato M (2019) An innovative harmonic radar to track flying insects: the case of *Vespa velutina*. Sci Rep 9:11964. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48511-8

Mallon EB, Brockmann A, Schmid-Hempel P (2003) Immune response inhibits associative learning in insects. Proc R Soc Lond. https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2456

Manfredini F, Arbetman M, Toth AL (2019) A potential role for phenotypic plasticity in invasions and declines of social insects. Front Ecol Evol 7:375.

Manson JS, Otterstatter MC, Thomson JD (2009) Consumption of a nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees. Oecologia

Martin SJ (1993) Weight changes in adult hornets,*Vespa affinis* (Hymenoptera: Vespidae). Insectes Sociaux 40:363–368. https://doi.org/10.1007/BF01253899

Martin SJ (1990) Nest thermoregulation in *Vespa simillima*, *V. tropica* and *V. analis*. Ecol Entomol 15:301–310. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1990.tb00812.x

Masciocchi M, Corley J (2013) Distribution, dispersal and spread of the invasive social wasp (*Vespula germanica*) in Argentina. Austral Ecol 38:162–168. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2012.02388.x

Matsuura M (1991) 7. Vespa and Provespa. In: Ross KG, Matthews RW (eds) The Social Biology of Wasps. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp 232–262

Matsuura M, Yamane S (1990) Biology of the vespine wasps. Springer Verlag

Mayerhofer J, Lutz A, Dennert F, et al (2019) A species-specific multiplexed PCR amplicon assay for distinguishing between *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum*, *M. pingshaense* and *M. robertsii*. J Invertebr Pathol 161:23–28. https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.01.002

Mayorga-Ch D, Castro-Cortés NC, Rodríguez C, Sarmiento CE (2021) Behavioral responses of the social wasp *Polistes myersi* to prey infected with fungi used in biological control. J Insect Behav 34:136–149. https://doi.org/10.1007/s10905-021-09775-z

McGruddy R, Howse MWF, Haywood J, et al (2021) Nesting ecology and colony survival of two invasive *Polistes* wasps (Hymenoptera: Vespidae) in New Zealand. Environ Entomol 50:1466–1473. https://doi.org/10.1093/ee/nvab086

Mehmood N, Hassan A, Zhou W, et al (2022) Behavioural alterations in female *Aedes aegypti* mosquito in response to entomopathogenic fungal infections. Pest Manag Sci 78:2065–2073. https://doi.org/10.1002/ps.6832

Menzel R, Manz G, Menzel R, Greggers U (2001) Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the Intertrial Interval, and the Test Interval. Learn Mem 8:198–208. https://doi.org/10.1101/lm.40001

Meurville M-P, LeBoeuf AC (2021) Trophallaxis: the functions and evolution of social fluid exchange in ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecol News 31:

Meyerson LA, Mooney HA (2007) Invasive alien species in an era of globalization. Front Ecol Environ 5:199–208. https://doi.org/10.1890/1540-9295(2007)5[199:IASIAE]2.0.CO;2

Meyling NV, Eilenberg J (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biol Control 43:145–155. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007

Mglich M, Maschwitz U, Hlldobler B (1974) Tandem calling: a new kind of signal in ant communication. Science 186:1046–1047. https://doi.org/10.1126/science.186.4168.1046

Mobley MW, Gegear RJ (2018) Immune-cognitive system connectivity reduces bumblebee foraging success in complex multisensory floral environments. Sci Rep 8:5953. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24372-5

Moller H (1996) Lessons for invasion theory from social insects. Biol Conserv 78:125–142. https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00022-5

Monceau K, Arca M, Leprêtre L, et al (2013a) Native prey and invasive predator patterns of foraging activity: the case of the Yellow-legged hornet predation at European honeybee hives. PLoS ONE 8:e66492. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066492

Monceau K, Arca M, Leprêtre L, et al (2018) How Apis mellifera Behaves with its Invasive Hornet Predator Vespa velutina? J Insect Behav 31:1–11. https://doi.org/10.1007/s10905-017-9658-5

Monceau K, Bonnard O, Thiéry D (2014) *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. J Pest Sci 87:1–16. https://doi.org/10.1007/s10340-013-0537-3

Monceau K, Bonnard O, Thiéry D (2012) Chasing the queens of the alien predator of honeybees: a water drop in the invasiveness ocean. Open J Ecol 2:183–191. https://doi.org/10.4236/oje.2012.24022

Monceau K, Maher N, Bonnard O, Thiéry D (2015a) Evaluation of competition between a native and an invasive hornet species: do seasonal phenologies overlap? Bull Entomol Res 105:462–469. https://doi.org/10.1017/S0007485315000280

Monceau K, Maher N, Bonnard O, Thiéry D (2013b) Predation pressure dynamics study of the recently introduced honeybee killer *Vespa velutina*: learning from the enemy. Apidologie 44:209–221. https://doi.org/10.1007/s13592-012-0172-7

Monceau K, Moreau J, Poidatz J, et al (2015b) Behavioral syndrome in a native and an invasive hymenoptera species: behavioral syndrome in hymenoptera species. Insect Sci 22:541–548. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12140

Monceau K, Thiéry D (2017) *Vespa velutina* nest distribution at a local scale: an 8-year survey of the invasive honeybee predator. Insect Sci 24:663–674. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12331

Monceau K, Tourat A, Arca M, et al (2017) Daily and seasonal extranidal behaviour variations in the invasive Yellow-legged hornet, *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae). J Insect Behav 30:220–230. https://doi.org/10.1007/s10905-017-9607-3

Monchanin C, Blanc-Brude A, Drujont E, et al (2021a) Chronic exposure to trace lead impairs honey bee learning. Ecotoxicol Environ Saf 212:112008. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112008

Monchanin C, Drujont E, Devaud J-M, et al (2021b) Metal pollutants have additive negative effects on honey bee cognition. J Exp Biol 224:jeb241869. https://doi.org/10.1242/jeb.241869

Moore D, Reed M, Le Patourel G, et al (1992) Reduction of feeding by the desert locust, *Schistocerca gregaria*, after infection with Metarhizium flavoviride. J Invertebr Pathol 60:304–307. https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90013-T

Moret Y, Schmid-Hempel P (2000) Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. Science 290:1166–1168. https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1166

Müller CB, Schmid-Hempel P (1993) Exploitation of cold temperature as defence against parasitoids in bumblebees. Nature 363:65–67. https://doi.org/10.1038/363065a0

Nentwig W (ed) (2008) Biological invasions. Springer, Berlin

Nicolson SW (2011) Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. Afr Zool 46:

Nicolson SW, Thornburg RW (2007) Nectar chemistry. Springer Netherlands, Dordrecht

Nieh J (2009) Convergent evolution of food recruitment mechanisms in bees and wasps. In: Organization of Insect Societies: From Genome to Sociocomplexity. Harvard University Press

Noll FB, Wenzel JW, Zucchi R (2004) Evolution of caste in neotropical swarm-founding wasps (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini). Am Mus Novit 25

Nychka D, Furrer R, Paige J, Sain S (2021) fields: Tools for spatial data

Ochocki BradM, Miller TEX (2017) Rapid evolution of dispersal ability makes biological invasions faster and more variable. Nat Commun

Okuno M, Tsuji K, Sato H, Fujisaki K (2012) Plasticity of grooming behavior against entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the ant *Lasius japonicus*. J Ethol 30:23–27. https://doi.org/10.1007/s10164-011-0285-x

Ono M, Igarashi T, Ohno E, Sasaki M (1995) Unusual thermal defence by a honeybee against mass attack by hornets. Nature 377:334–336. https://doi.org/10.1038/377334a0

Osborne JL, Williams IH, Carreck NL, et al (1997) Harmonic radar: a new technique for investigating bumblebee and honeybee foraging flight. Acta Hortic 159–164. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.437.15

Otterstatter MC, Thomson JD (2007) Contact networks and transmission of an intestinal pathogen in bumble bee (*Bombus impatiens*) colonies. Oecologia 154:411–421. https://doi.org/10.1007/s00442-007-0834-8

Overmyer SL, Jeanne RL (1998) Recruitment to food by the German yellowjacket, *Vespula germanica*. Behav Ecol Sociobiol 42:17–21. https://doi.org/10.1007/s002650050407

Parent CE, Peck SB, Causton CE, et al (2020) *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae), an introduced wasp in the Galapagos islands: its life cycle and ecological impact. Environ Entomol 49:1480–1491. https://doi.org/10.1093/ee/nvaa110

Pasteels J, Deneubourg J-L (1987) From individual to collective behavior in social insects

Peat J, Darvill B, Ellis J, Goulson D (2005) Effects of climate on intra- and interspecific size variation in bumble-bees. Funct Ecol 19:145–151. https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2005.00946.x

Peat J, Goulson D (2005) Does intraspecific size variation in bumblebees allow colonies to efficiently exploit different flowers? Ecol Entomol 30:176–181

Pebesma EJ, Bivand R Classes and methods for spatial data in R. R News 5:9–13

Pereira H, Detrain C (2020) Pathogen avoidance and prey discrimination in ants. R Soc Open Sci 7:191705. https://doi.org/10.1098/rsos.191705

Perez R, Aron S (2020) Adaptations to thermal stress in social insects: recent advances and future directions. Biol Rev 95:1535–1553. https://doi.org/10.1111/brv.12628

Pérez-De-Heredia I, Darrouzet E, Goldarazena A, et al (2017) Differentiating between gynes and workers in the invasive hornet Vespa velutina (Hymenoptera,Vespidae) in Europe. J Hymenopt Res 60:119–133. https://doi.org/10.3897/jhr.60.13505

Perrard A, Arca M, Rome Q, et al (2014) Geographic variation of melanisation patterns in a hornet species: genetic differences, climatic pressures or aposematic constraints? PLoS ONE 9:e94162. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094162

Perrings C, Dehnen-Schmutz K, Touza J, Williamson M (2005) How to manage biological invasions under globalization. Trends Ecol Evol 20:212–215. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.011

Phillips BL, Brown GP, Travis JMJ, Shine R (2008) Reid's paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. Am Nat 172:S34–S48. https://doi.org/10.1086/588255

Phillips BL, Brown GP, Webb JK, Shine R (2006) Invasion and the evolution of speed in toads. Nature 439:803–803. https://doi.org/10.1038/439803a

Pimentel D (2009) Pesticides and pest Control. In: Peshin R, Dhawan AK (eds) Integrated pest management: innovation-development process. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 83–87

Pimentel D, Perkins JH (2019) Pest control: cultural and environmental aspects. CRC Press

Pimentel D, Zuniga R, Morrison D (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. Ecol Econ 52:273–288. https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2004.10.002

Pinheiro J, Bates D, R Core Team (2023) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models

Pinheiro JC, Bates DM (2000) Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. Springer. https://doi.org/10.1007/b98882

Poidatz J (2017) De la biologie des reproducteurs au comportement d'approvisionnement du nid, vers des pistes de biocontrôle du frelon asiatique *Vespa velutina* en France. Université de Bordeaux

Poidatz J, Bressac C, Bonnard O, Thiéry D (2018a) Comparison of reproductive traits of foundresses in a native and an invasive hornet in Europe. J Insect Physiol 109:93–99. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.004

Poidatz J, López Plantey R, Thiéry D (2018b) Indigenous strains of *Beauveria* and *Metharizium* as potential biological control agents against the invasive hornet *Vespa velutina*. J Invertebr Pathol 153:180–185. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.021

Poidatz J, Monceau K, Bonnard O, Thiéry D (2018c) Activity rhythm and action range of workers of the invasive hornet predator of honeybees *Vespa velutina*, measured by radio frequency identification tags. Ecol Evol 8:7588–7598. https://doi.org/10.1002/ece3.4182

Portha S (2002) Self-organized asymmetries in ant foraging: a functional response to food type and colony needs. Behav Ecol 13:776–781. https://doi.org/10.1093/beheco/13.6.776

Povey S, Cotter SC, Simpson SJ, Wilson K (2014) Dynamics of macronutrient self-medication and illness-induced anorexia in virally infected insects. J Anim Ecol 83:245–255. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12127

Quesada-Moraga E, Santos-Quirós R, Valverde-García P, Santiago-Álvarez C (2004) Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J Invertebr Pathol 87:51–58. https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.07.002

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing

Raine NE, Chittka L (2012) No trade-off between learning speed and associative flexibility in bumblebees: A reversal learning test with multiple colonies. PLoS ONE 7:e45096. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045096

Rehner SA, Kepler RM (2017) Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. J Invertebr Pathol 148:60–66. https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.05.008

Rendell L, Boyd R, Cownden D, et al (2010) Why copy others? Insights from the social learning strategies tournament. Science 328:208–213. https://doi.org/10.1126/science.1184719

Requier F, Fournier A, Pointeau S, et al (2022) Economic costs of the invasive asian hornet on honey bees. SSRN Electron J. https://doi.org/10.2139/ssrn.4280914

Requier F, Rome Q, Chiron G, et al (2019) Predation of the invasive Asian hornet affects foraging activity and survival probability of honey bees in Western Europe. J Pest Sci 92:567–578. https://doi.org/10.1007/s10340-018-1063-0

Richardson LL, Adler LS, Leonard AS, et al (2015) Secondary metabolites in floral nectar reduce parasite infections in bumblebees. Proc R Soc B Biol Sci 282:20142471. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2471

Richter MR (2000) Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. Annu Rev Entomol 45:121–150. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.121

Ries C, Schneider N, Vitali F, Weigand A (2021) First records and distribution of the invasive alien hornet *Vespa velutina nigrithorax* du Buysson, 1905 (Hymenoptera: Vespidae) in Luxembourg. 123:181–193

Riley JR, Smith AD, Reynolds DR, et al (1996) Tracking bees with harmonic radar. Nature 379:29–30. https://doi.org/10.1038/379029b0

Riveros AJ, Gronenberg W (2010) Brain allometry and neural plasticity in the bumblebee *Bombus occidentalis*. Brain Behav Evol 75:138–148. https://doi.org/10.1159/000306506

Robinet C, Suppo C, Darrouzet E (2017) Rapid spread of the invasive yellow-legged hornet in France: the role of human-mediated dispersal and the effects of control measures. J Appl Ecol 54:205–215. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12724

Rodríguez M, Gerding M, France A, Ceballos R (2009) Evaluation of *Metarhizium anisopliae var. anisopliae* Qu-M845 Isolate to Control Varroa destructor (Acari: Varroidae) in Laboratory and Field Trials. Chil J Agric Res 69:. https://doi.org/10.4067/S0718-58392009000400009

Rojas-Nossa SV, Calviño-Cancela M (2020a) The invasive hornet *Vespa velutina* affects pollination of a wild plant through changes in abundance and behaviour of floral visitors. Biol Invasions 22:2609–2618. https://doi.org/10.1007/s10530-020-02275-9

Rojas-Nossa SV, Calviño-Cancela M (2020b) The invasive hornet Vespa velutina affects pollination of a wild plant through changes in abundance and behaviour of floral visitors. Biol Invasions 22:2609–2618. https://doi.org/10.1007/s10530-020-02275-9

Rojas-Nossa SV, Dasilva-Martins D, Mato S, et al (2022) Effectiveness of electric harps in reducing *Vespa velutina* predation pressure and consequences for honey bee colony development. Pest Manag Sci 78:5142–5149. https://doi.org/10.1002/ps.7132

Rojas-Nossa SV, Novoa N, Serrano A, Calviño-Cancela M (2018) Performance of baited traps used as control tools for the invasive hornet *Vespa velutina* and their impact on non-target insects. Apidologie 49:872–885. https://doi.org/10.1007/s13592-018-0612-0

Rojas-Nossa SV, O'Shea-Wheller TA, Poidatz J, et al (2023) Predator and pollinator? An invasive hornet alters the pollination dynamics of a native plant. Basic Appl Ecol. https://doi.org/10.1016/j.baae.2023.07.005

Rollins LA, Richardson MF, Shine R (2015) A genetic perspective on rapid evolution in cane toads (*Rhinella marina*). Mol Ecol 24:2264–2276. https://doi.org/10.1111/mec.13184

Rome Q, Dambrine L, Onate C, et al (2013) Spread of the invasive hornet *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, in Europe in 2012 (Hym., Vespidae). Bull Société Entomol Fr 118:21–22

Rome Q, Muller FJ, Touret-Alby A, et al (2015) Caste differentiation and seasonal changes in *Vespa velutina* (Hym.: Vespidae) colonies in its introduced range. J Appl Entomol 139:771–782. https://doi.org/10.1111/jen.12210

Rome Q, Perrard A, Muller F, et al (2021) Not just honeybees: predatory habits of *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae) in France. Ann Société Entomol Fr NS 57:1–11. https://doi.org/10.1080/00379271.2020.1867005

Roy HE, Adriaens T, Isaac NJB, et al (2012) Invasive alien predator causes rapid declines of native European ladybirds: Alien predator causes declines of native ladybirds. Divers Distrib 18:717–725. https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00883.x

Ruedenaueur FA, Raubenheimer D, Kessner-Beierlein D, et al (2020) Best be(e) on low fat: linking nutrient perception, regulation and fitness. Ecol Lett

Sakai Y, Takahashi J (2014) Discovery of a worker of *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae) from Tsushima Island, Japan. Jpn J Entomol 17:32–36

Samuels RI, Charnley AK, Reynolds SE (1988) The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Mycopathologia 104:51–58. https://doi.org/10.1007/BF00437924

Sánchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, et al (2016) Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. Environ Int 89–90:7–11. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009

Santoro D, Hartley S, Suckling DM, Lester PJ (2015) Nest-based information transfer and foraging activation in the common wasp (*Vespula vulgaris*). Insectes Sociaux 62:207–217. https://doi.org/10.1007/s00040-015-0395-5

Schmid-Hempel P (2001) On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. Naturwissenschaften 88:147–158. https://doi.org/10.1007/s001140100222

Schmid-Hempel P (1998) Parasites in Social Insects. Princeton University Press

Scholte E-J, Knols BGJ, Takken W (2006) Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. J Invertebr Pathol 91:43–49. https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.006

Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. Toxicon 56:1267–1274. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008

Scofield HN, Mattila HR (2015) Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. PLOS ONE 10:e0121731. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121731

Seyoum E, Bateman RP, Charnley AK (2002) The effect of *Metarhizium anisopliae var acridum* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. J Appl Entomol 126:119–124. https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2002.00609.x

Shanmuganathan T, Pallister J, Doody S, et al (2010) Biological control of the cane toad in Australia: a review. Anim Conserv 13:16–23. https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00319.x

Shaw FR, Weidhaas J Jr (1956) Distribution and habits of the Giant hornet in North America. J Econ Entomol 49:275. https://doi.org/10.1093/jee/49.2.275

Shaw KE, Davidson G, Clark SJ, et al (2002) Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. Biol Control 24:266–276. https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00029-4

Sheehan MJ, Tibbetts EA (2011) Specialized face learning is associated with individual recognition in paper wasps. Science 334:1272–1275. https://doi.org/10.1126/science.1211334

Shi M, Guo Y, Dong K, et al (2023) A review of factors influencing diapause in bumble bee queens. Insectes Sociaux 70:157–165. https://doi.org/10.1007/s00040-023-00903-w

Shields MW, Johnson AC, Pandey S, et al (2019) History, current situation and challenges for conservation biological control. Biol Control 131:25–35. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.12.010

Shine R, Brown GP, Phillips BL (2011) An evolutionary process that assembles phenotypes through space rather than through time. Proc Natl Acad Sci U S A 108:5708–5711. https://doi.org/10.1073/pnas.1018989108

Simberloff D, Martin J-L, Genovesi P, et al (2013) Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. Trends Ecol Evol 28:58–66. https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.013

Simmons AD, Thomas CD (2004) Changes in dispersal during species' range expansions. Am Nat 164:378–395. https://doi.org/10.1086/423430

Simone-Finstrom MD, Spivak M (2012) Increased resin collection after parasite challenge: a case of self-medication in honey bees? PLOS ONE 7:e34601. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034601

Simpson S, Clissold F, Lihoreau M, et al (2014) Recent advances in the integrative nutrition of arthropods. Annu Rev Entomol 60:293–311. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020917

Simpson SJ, Raubenheimer D (2012) The nature of nutrition: a unifying framework from animal adaptation to human obesity. In: The Nature of Nutrition. Princeton University Press

Smagghe G, De Meyer L, Meeus I, Mommaerts V (2013) Safety and acquisition potential of *Metarhizium anisopliae* in entomovectoring with bumble bees, *Bombus terrestris*. J Econ Entomol 106:277–282. https://doi.org/10.1603/EC12332

Smit J, Noordijk J, Zeegers T (2018) Will the Asian hornet (*Vespa velutina*) settle in the Nederlands? Entomol Ber 78:2–6

Sol D, Székely T, Liker A, Lefebvre L (2007) Big-brained birds survive better in nature. Proc R Soc B Biol Sci 274:763–769. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3765

Sorensen AA, Kamas RS, Vinson SB (1983) The influence of oral secretions from larvae on levels of proteinases in colony members of *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). J Insect Physiol 29:163–168. https://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90140-3

Spivak M, Goblirsch M, Simone-Finstrom M (2019) Social-medication in bees: the line between individual and social regulation. Curr Opin Insect Sci 33:49–55. https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.02.009

Srinivasan MV (2010) Honey bees as a model for vision, perception, and cognition. Annu Rev Entomol 55:267–284. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.010908.164537

Srinivasan MV (2006) Honeybee vision: in good shape for shape recognition. Curr Biol 16:R58–R60. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.002

Stabentheiner A, Nagy JM, Kovac H, et al (2022) Effect of climate on strategies of nest and body temperature regulation in paper wasps, *Polistes biglumis* and *Polistes gallicus*. Sci Rep 12:3372. https://doi.org/10.1038/s41598-022-07279-0

Strang CG, Sherry DF (2014) Serial reversal learning in bumblebees (*Bombus impatiens*). Anim Cogn 17:723–734. https://doi.org/10.1007/s10071-013-0704-1

Stroeymeyt N, Casillas-Pérez B, Cremer S (2014) Organisational immunity in social insects. Curr Opin Insect Sci 5:1–15. https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.001

Stroeymeyt N, Grasse AV, Crespi A, et al (2018) Social network plasticity decreases disease transmission in a eusocial insect. Science 362:941–945. https://doi.org/10.1126/science.aat4793

Suarez AV, Tsutsui D (2008) The evolutionary consequences of biological invasions. Mol Biol 17:351:360.

Szabo B, Damas-Moreira I, Whiting MJ (2020) Can cognitive ability give invasive species the means to succeed? A review of the evidence. Front Ecol Evol 8:187. https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00187

Tabadkani SM, Nozari J, Lihoreau M (2012) Inbreeding and the evolution of sociality in arthropods. Naturwissenschaften 99:779–788. https://doi.org/10.1007/s00114-012-0961-x

Tahir N, Brooker G (2011) Recent developments and recommendations for improving harmonic radar tracking systems. In: Proceedings of the 5th European Conference on Antennas and Propagation (EUCAP). pp 1531–1535

Takahashi R, Okuyama H, Minoshima YN, Takahashi J-I (2018) Complete mitochondrial DNA sequence of the alien hornet *Vespa velutina* (Insecta: Hymenoptera) invading Kyushu Island, Japan. Mitochondrial DNA Part B 3:179–181. https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1437823

Takeuchi T, Takahashi R, Kiyoshi T, et al (2017) The origin and genetic diversity of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina* introduced in Japan. Insectes Sociaux 64:313–320. https://doi.org/10.1007/s00040-017-0545-z

Tallamy DW, Whittington DP, Defurio F, et al (1998) Sequestered cucurbitacins and pathogenicity of <i>Metarhizium anisopliae<i> (Moniliales: Moniliaceae) on spotted cucumber beetle eggs and larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). Environ Entomol 27:366–372. https://doi.org/10.1093/ee/27.2.366

Tan K, Radloff SE, Li JJ, et al (2007) Bee-hawking by the wasp, *Vespa velutina*, on the honeybees *Apis cerana* and *A. mellifera*. Naturwissenschaften 94:469–472. https://doi.org/10.1007/s00114-006-0210-2

Tefera T, Pringle KL (2003) Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. J Invertebr Pathol 84:220–225. https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.11.001

Therneau TM (2023) A package to survival analysis in R

Thomas CD, Moller H, Plunkett GM, Harris RJ (1990) The prevalence of introduced *Vespula Vulgaris* wasps in a New Zealand beech forest community. N Z J Ecol 13:63–72

THOMAS MB, BLANFORD S, LOMER CJ (1997) Reduction of feeding by the variegated rrasshopper, *Zonocerus variegatus*, following infection by the fungal pathogen, *Metarhizium flavoviride*. Biocontrol Sci Technol 7:327–334. https://doi.org/10.1080/09583159730730

Tinbergen N (1932) The animal in its world : explorations of an ethologist, Harvard University Press

Toledo-Hernández RA, Toledo J, Sánchez D (2018) Effect of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on food consumption and mortality in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). Int J Trop Insect Sci 38:254–260. https://doi.org/10.1017/S1742758418000073

Tranter C, LeFevre L, Evison SEF, Hughes WOH (2015) Threat detection: contextual recognition and response to parasites by ants. Behav Ecol 26:396–405. https://doi.org/10.1093/beheco/aru203

Tudi M, Daniel Ruan H, Wang L, et al (2021) Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. Int J Environ Res Public Health 18:1112. https://doi.org/10.3390/ijerph18031112

Turchi L, Derijard B (2018) Options for the biological and physical control of *Vespa velutina* nigrithorax (Hym.: Vespidae) in Europe: A review. J Appl Entomol 142:553–562. https://doi.org/10.1111/jen.12515

Ueno T (2015) Flower-visiting by the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae). Int J Chem Environ Biol Sci 3:444–448

Valdovinos FS, Berlow EL, Moisset de Espanés P, et al (2018) Species traits and network structure predict the success and impacts of pollinator invasions. Nat Commun 9:2153. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04593-y

Valero A, Macías Garcia C, Magurran AE (2008) Heterospecific harassment of native endangered fishes by invasive guppies in Mexico. Biol Lett 4:149–152. https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0604

van der Vecht J (1957) The Vespinae of the Indo-Malayan and Papuan Areas (Hymenoptera, Vespidae). Zool Verh 34:1–82

van der Woude E, Huigens ME, Smid HM (2018) Differential effects of brain size on memory performance in parasitic wasps. Anim Behav 141:57–66. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.05.011

Van Itterbeeck J, Feng Y, Zhao M, et al (2021) Rearing techniques for hornets with emphasis on *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae): A review. J Asia-Pac Entomol 24:103–117. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.03.009

Vaudo AD, Patch HM, Mortensen DA, et al (2016) Macronutrient ratios in pollen shape bumble bee (*Bombus impatiens*) foraging strategies and floral preferences. Proc Natl Acad Sci 113:E4035–E4042. https://doi.org/10.1073/pnas.1606101113

Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, et al (2009) Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecol 2:149–159. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001

Verdasca MJ, Godinho R, Rocha RG, et al (2022) A metabarcoding tool to detect predation of the honeybee *Apis mellifera* and other wild insects by the invasive *Vespa velutina*. J Pest Sci 95:997–1007. https://doi.org/10.1007/s10340-021-01401-3

Vidal C (2022) The Asian wasp *Vespa velutina nigrithorax*: Entomological and allergological characteristics. Clin Exp Allergy 52:489–498. https://doi.org/10.1111/cea.14063

Vidal C, Armisén M, Monsalve R, et al (2019) Anaphylaxis to *Vespa velutina nigrithorax*: pattern of sensitization for an emerging problem in Western Countries. J Investig Allergol Clin Immunol 31:. https://doi.org/10.18176/jiaci.0474

Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, et al (2011a) Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents

with niche models. Biol Conserv 144:2142–2150. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.04.009

Villemant C, Muller F, Haubois S, et al (2011b) Bilan des travaux (MNHN et IRBI) sur l'invasion en France de *Vespa velutina*, le frelon asiatique prédateur d'abeilles. 11

Villemant C, Streito J-C, Haxaire J (2011c) Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). Proceeding Journ Sci Apic-11 Febr 5

Villemant C, Zuccon D, Rome Q, et al (2015) Can parasites halt the invader? Mermithid nematodes parasitizing the yellow-legged Asian hornet in France. PeerJ 3:e947. https://doi.org/10.7717/peerj.947

Von Frisch K (1967) The Dance language and orientation of bees. Harvard University Press

von Helversen D, von Helversen O (2003) Object recognition by echolocation: a nectar-feeding bat exploiting the flowers of a rain forest vine. J Comp Physiol A 189:327–336. https://doi.org/10.1007/s00359-003-0405-3

Walter G-R Alien species in a warmer world : risks and opportunities

Wehner R (1967) Pattern recognition in bees. Nature 215:1244–1248. https://doi.org/10.1038/2151244a0

Wheeler WM (1928) The social insects - their origin and evolution

Wickham H, François R, Henry L, et al (2023) dplyr: A Grammar of Data Manipulation

Wilson EB (1927) Probable inference, the law of succession, and statistical inference. J Am Stat Assoc 22:209–212

Wilson EO (1962) Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima* (Fr. Smith) 2. An information analysis of the odour trail. Anim Behav 10:148–158. https://doi.org/10.1016/0003-3472(62)90142-2

Wilson TM, Takahashi J, Spichiger S-E, et al (2020) First Reports of *Vespa mandarinia* (Hymenoptera: Vespidae) in North America represent two separate maternal lineages in Washington State, United States, and British Columbia, Canada. Ann Entomol Soc Am 113:468–472. https://doi.org/10.1093/aesa/saaa024

Witt R (2015) Erstfund eines Nestes der Asiatischen Hornisse *Vespa velutina* Lepeletier,1838 in Deutschland und Details zum Nestbau (Hymenoptera, Vespinae)

Woodard SH, Duennes MA, Watrous KM, Jha S (2019) Diet and nutritional status during early adult life have immediate and persistent effects on queen bumble bees. Conserv Physiol 7:coz048. https://doi.org/10.1093/conphys/coz048

Woodgate JL, Makinson JC, Rossi N, et al (2021) Harmonic radar tracking reveals that honeybee drones navigate between multiple aerial leks. iScience 24:102499. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102499

Worden BD, Papaj DR (2005) Flower choice copying in bumblebees. Biol Lett 1:504–507. https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0368

Wright TF, Eberhard JR, Hobson EA, et al (2010) Behavioral flexibility and species invasions: the adaptive flexibility hypothesis. Ethol Ecol Evol 22:393–404. https://doi.org/10.1080/03949370.2010.505580

Wycke M-A, Perrocheau R, Darrouzet É (2018) Sarracenia carnivorous plants cannot serve as efficient biological control of the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax* in Europe. Rethink Ecol 3:41–50. https://doi.org/10.3897/rethinkingecology.3.28516

Yanagawa A, Shimizu S (2007) Resistance of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki to *Metarhizium anisopliae* due to grooming. BioControl 52:75–85. https://doi.org/10.1007/s10526-006-9020-x

Yin L, Clark MD, Burkness EC, Hutchison WD (2019) Grape phylloxera (Hemiptera: Phylloxeridae), on cold-hardy hybrid wine grapes (Vitis spp.): a review of pest biology, damage, and management practices. J Integr Pest Manag 10:16. https://doi.org/10.1093/jipm/pmz011

Zacharuk RY (1971) Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). IV. Development within the host. Can J Microbiol 17:525–529. https://doi.org/10.1139/m71-087

Zang L-S, Wang S, Zhang F, Desneux N (2021) Biological Control with Trichogramma in China: History, Present Status, and Perspectives. Annu Rev Entomol 66:463–484. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-060120-091620

Zeil J, Kelber A, Voss R (1996) Structure and function of learning flights in bees and wasps. J Exp Biol 199:245–252. https://doi.org/10.1242/jeb.199.1.245

Zhang W (2018) Global pesticide use: profile, trend, cost / benefit and more. 8:1–27

Zhukovskaya M, Yanagawa A, Forschler B (2013) Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. Insects 4:609–630. https://doi.org/10.3390/insects4040609

Zimmermann G (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Sci Technol 17:879–920. https://doi.org/10.1080/09583150701593963

ANNEXES

ANNEXE 1 : PRÉSENTATION DES ACTIVITÉS DE RECHERCHES, DE VULGARISATION SCIENTIFIQUE ET D'ENCADREMENT AU COURS DE LA THESE

Productions scientifiques

Articles scientifiques

Lacombrade et al. 2023, Flexible visual learning and memory in nectar foraging hornets, *Behavioral Ecology and Sociobiology*

Lihoreau M., [...] Lacombrade M., [...] 2022, Why bumblebees have become model species in apidology: a brief history and perspectives, *Accepted by Apidologie*

Communications orales

Lacombrade et al. 2022, Lutte biologique contre le frelon asiatique: Utilisation d'un entomopathogène, *Invitée par l'Association pour le Développement de l'Apiculture en Occitanie*
11 nov, Mèze, France

Lacombrade et al. 2022, Cognitive flexibility in Asian hornet, *8th European Student Conference on Behaviour & Cognition*
3-7 sept, Rovereto, Italie

Lacombrade et al. 2022, A citizen science project: Studying the invasion mechanisms of the Asian hornet in Europe, *International Congres for International Union for the Study of Social Insects (IUSSI) 2022*
3-7 juillet, San Diego, Californie, Etats-Unis

Lacombrade et al. 2022, Les capacités cognitives du frelon asiatique: vers de nouveaux moyens de lutte, *Invitée au forum des sciences cognitives de l'Université Paul Sabatier*
25 mai, Toulouse, France

Lacombrade et al. 2021, Morphological correlates of dispersal capacities in the Yellow-legged hornet, *European Congres for IUSSI 2021*
7 oct, virtual conference (covid)

Lacombrade et al. 2018, Ontogenèse des comportements des reines et des interactions sociales chez la fourmi polygyne, *Institut Francilien d'Ethologie - Poster*
Paris, France

Vulgarisation scientifique

2023

Vidéo portrait pour la journée des droits des femmes, *"Les jeunes chercheuses à l'honneur"*
Vidéo de présentation des recherches réalisée par le pôle égalité femme/homme du CRCA (https ://crca.cbi-toulouse.fr/actualite/le-crca-au-feminin/)

2022

La nuit des chercheurs: les chercheurs passent le grand oral, *Musée d'histoire naturelle*
Simulation devant lycéens d'un grand oral (examen du baccalauréat) sur mon sujet thèse.

Participation à la réalisation du film promotionnel du laboratoire CRCA
Film adressé aux étudiant.e.s et grand public. Collaboration entre les doctorants du laboratoire de la conception à la réalisation (https://crca.cbi-toulouse.fr/le-laboratoire/presentation/)

Finale Régionale MT180sec Occitanie, *Théâtre Sorano*
Concours de présentation de mon sujet de thèse en 3 min. Disponible sur YouTube (https://www.youtube.com/watch?v=pWs8r5rQHXM)

Portrait pour la journée des droits des femmes, *"Les jeunes chercheuses à l'honneur"*
Article réalisé par le pôle égalité femme/homme du CRCA (https://crca.cbi-toulouse.fr/actualite/les-jeunes-chercheuses-du-crca-a-lhonneur/)

2021

Participation au programme Déclics, *Lycée Berthelot*
Rencontre et échanges avec des lycéens autour de travaux de thèse/ parcours/ être doctorante

Bourse

Bourse pour la participation au congrès de l'International Union for the Study of Social Insects 2022 (1800 euros), *Section Française de l'IUSSI*

Encadrements

Zoé Tourrain, *Assistante Ingénieure (depuis 2022), INRAe Bordeaux, France*

Naïs Rocher, *Assistante Ingénieure (2021-2022), INRAe Bordeaux, France*

Blandine Mahot-Castaing, *Assistante Ingénieure (2022-2023), CRCA, Toulouse, France*

Maxence Carrucio (L3, Université Paul Sabatier, Toulouse), *Volontaire 2 mois (2022), CRCA, Toulouse, France*

Nolween Boutemeur (L3, Université Paul Sabatier, Toulouse), *Volontaire 2 mois (2022), CRCA, Toulouse, France*

Charlotte Charreton (L3, Université de Lille), *Volontaire 2 mois (2022), CRCA, Toulouse, France*

Mael Rannou (M1&M2, Université de Rennes), *Stagiaire 2 mois (2021) et 6 mois (2022)*

Occiane Fousset, *Volontaire Service Civique (2020-2021), CRCA, Toulouse, France*

Louis Duportal (M1, Université d'Angers), *Stagiaire 2 mois (2021), CRCA, Toulouse, France*

Certificat

MOOC Formation à l'intégrité scientifique dans les métiers de la recherche, *Université Bordeaux*2020

TOEIC Listening and reading

ANNEXE 2 : FIGURES ET RÉSULTATS STATISTIQUES SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 1

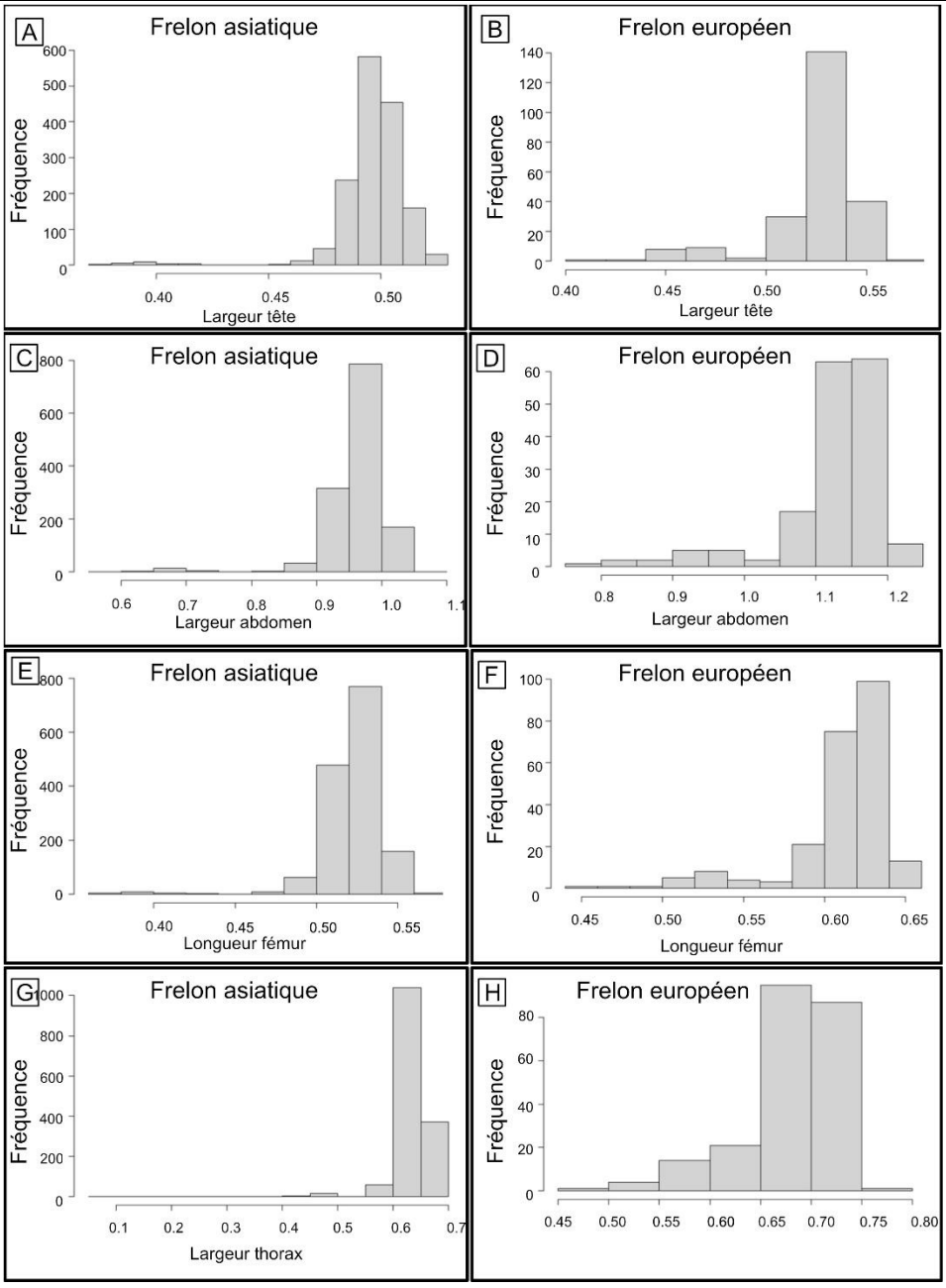


Figure 44

Distribution de la fréquence des mesures de la taille du corps pour tous les spécimens. A,B) Largeur de la tête, C,D) Largeur de l'abdomen, E,F) Longueur du fémur, G,H) Largeur du thorax des individus de l'espèce A,C,E,G) *V. velutina*. B,D,F,H) *V. Crabro.* Cette analyse a été utilisée pour discriminer les fondatrices et les ouvrières. Pour les frelons asiatiques, nous avons retenu les individus qui avaient une tête supérieure à 0,45 cm, un abdomen supérieur à 0,8 cm, un fémur supérieur à 0,44 cm et un thorax supérieur à 0,4 cm. Pour les frelons européens, nous avons retenu les individus dont la tête était supérieure à 0,48 cm, l'abdomen supérieur à 1,04 cm et le fémur supérieur à 0,56 cm. Lorsqu'une mesure était manquante (par exemple, pas de données sur la largeur de la tête de l'individu), nous avons conservé l'individu s'il répondait aux autres critères. En utilisant ces critères, nous avons retenu 1530 frelons asiatiques sur 1558 et 212 frelons européens sur 234.

Tableau 9

Résultats statistiques des modèles sans distinction des fronts d'invasion. Ces modèles statistiques (LMM) permettent de tester l'influence de 5 variables environnementales sur la morphologie des frelons.

	Aspect ratio			**Largeur abdomen**			**Taille tête**			**Largeur ailes**			**Longueur ailes**			**Longueur fémur**			**Largeur thorax**		
	df	t	p	df	t	p	df	t	p	df	t	p	df	t	p	df	t	p	df	t	p
Frelon asiatique																					
Géographie	1214	-3,872	<0.001	1122	1,123	0,262	1334	-1,487	0,137	1292	-1,056	0,291	1268	-3,042	0,002	1293	-1,328	0,184	1282	-1,476	0,14
Precipitation	1214	0,347	0,728	1122	-0,53	0,596	1334	-0,293	0,77	1292	-0,409	0,683	1268	-0,253	0,8	1293	-0,73	0,465	1282	-0,003	0,997
Température estivale	1214	4,404	<0,001	1122	-0,082	0,935	1334	0,044	0,965	1292	-1,841	0,066	1268	0,492	0,622	1293	-0,65	0,515	1282	-0,358	0,72
Température hivernale	1214	0,898	0,369	1122	-0,353	0,725	1334	-1,483	0,138	1292	-2,49	0,013	1268	-2,545	0,011	1293	-1,63	0,103	1282	-2,411	0,016
Densité urbaine	1214	0,7	0,484	1122	0,348	0,728	1334	0,341	0,733	1292	-0,665	0,506	1268	0,02	0,984	1293	-0,296	0,767	1282	-0,028	0,977
Frelon européen																					
Géographie	152	-0,549	0,584	115	0,804	0,423	172	0,666	0,507	158	1,048	0,296	156	0,409	0,683	171	-0,237	0,813	162	-1,242	0,216
Precipitation	152	-0,975	0,331	115	0,652	0,516	172	0,532	0,596	158	1,13	0,26	156	0,802	0,424	171	0,423	0,673	162	0,917	0,36
Température estivale	152	-0,531	0,596	115	-3,15	0,002	172	-1,713	0,089	158	-0,194	0,847	156	-1,762	0,08	171	-0,527	0,599	162	-1,88	0,062
Température hivernale	152	-0,737	0,463	115	3,793	<0,001	172	2,102	0,037	158	1,709	0,089	156	2,111	0,036	171	1,549	0,123	162	1,241	0,216
Densité urbaine	22	1,084	0,29	23	0,925	0,365	24	-0,181	0,858	23	-1,161	0,258	22	-0,943	0,356	23	0,171	0,866	24	-1,705	0,101

Tableau 10

Résultats statistiques des modèles avec distinction des fronts d'invasion. Ces modèles statistiques (LMM) permettent de tester l'influence de 5 variables environnementales sur la morphologie des frelons.

	Aspect ratio			**Largeur abdomen**			**Taille tête**			**Largeur ailes**			**Longueur ailes**			**Longueur fémur**			**Largeur thorax**		
	df	t	p	df	t	p	df	t	p	df	t	p	df	t	p	df	t	p	df	t	p
Front Ibérique	71	-1,047	0,299	71	-0,589	0,558	71	-0,519	0,606	71	0,629	0,532	71	-0,728	0,469	71	-1,061	0,292	71	0,167	0,868
Front iItalien	71	2,19	0,032	71	-1,206	0,232	71	0,007	0,994	71	-1,23	0,224	71	-0,526	0,6	71	-0,945	0,348	71	0,745	0,459
Front Nord	71	1,7	0,094	71	-2,056	0,044	71	-0,791	0,432	71	1,253	0,214	71	2,181	0,033	71	-0,616	0,54	71	-1,716	0,091
Précipitation	647	0,727	0,468	575	-0,445	0,657	698	0,147	0,883	679	0,875	0,382	670	1,28	0,201	675	-0,09	0,928	671	-0,167	0,868
Température estivale	647	0,925	0,355	575	-1,034	0,302	698	-1,569	0,117	679	0,336	0,737	670	0,826	0,409	675	-1,434	0,152	671	-1,837	0,067
Température hivernale	647	1,607	0,109	575	-0,425	0,671	698	-0,833	0,405	679	-1,791	0,074	670	-0,715	0,475	675	-0,189	0,851	671	-2,159	0,031
Densité urbaine	647	1,403	0,161	575	1,522	0,129	698	1,435	0,152	679	-0,733	0,464	670	0,63	0,529	675	1,125	0,261	671	1,709	0,088

ANNEXE 3 : ARTICLE PUBLIÉ

Behavioral Ecology and Sociobiology (2023) 77:76
https://doi.org/10.1007/s00265-023-03349-z

ORIGINAL ARTICLE

Flexible visual learning in nectar-foraging hornets

Mathilde Lacombrade[1,2,3,4] · Monica Doblas-Bajo[5] · Naïs Rocher[2] · Zoé Tourrain[2] · Emmanuel Navarro[6] · Christian Lubat[6] · Fanny Vogelweith[3] · Denis Thiéry[2] · Mathieu Lihoreau[1]

Received: 28 March 2023 / Revised: 7 June 2023 / Accepted: 12 June 2023 / Published online: 24 June 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Pollinators, such as bees, develop flexible memories of colors, patterns, and shapes, for efficient flower recognition. Here we tested whether other flower-foraging insects have evolved similar cognitive abilities underpinning flexible visual learning. We trained wild hornets from two species commonly found in Europe, the invasive yellow-legged hornet (*Vespa velutina nigrithorax*) and the European hornet (*Vespa crabro*), to associate sucrose solution rewards to color stimuli in a Y-maze. Hornets from both species succeeded in differential and reversal learning and developed short-term memories of the learnt associations. Thus, just like bees, hornets can learn various visual cue-reward associations and remember them for at least 1 h for selecting flowers. Our study in non-model species illustrates how standard conditioning approaches can be used to explore and compare the cognitive abilities of animals sharing similar foraging ecologies.

Significance statement

Bees can learn an impressive diversity of visual cues to recognize the best rewarding flowers. This can be studied using Y-maze in which individual insects must learn to associate visual stimuli to the presence or absence of nectar rewards. Here, using the same approach, we show that hornets are also capable of these associations. We compared the learning abilities of hornets from two common species in Europe and found that they could similarly learn to discriminate two colors and keep this information in memory for at least 1 h. Hornets thus evolved visual cognition facilitating robust flower foraging, like bees and many other pollinators.

Keywords Asian hornet · European hornet · Appetitive conditioning · Reversal learning · Comparative cognition

This article is a contribution to the Topical Collection Toward a Cognitive Ecology of Invertebrates—Guest Editors: Aurore Avarguès-Weber and Mathieu Lihoreau

✉ Mathilde Lacombrade
lacombrademathilde@gmail.com

[1] Research Center on Animal Cognition (CRCA), Center for Integrative Biology (CBI), CNRS, University Paul Sabatier, Toulouse III, France

[2] UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRAe, F-33883 Villenave d'Ornon, France

[3] M2i Biocontrol, 370 route de Cauzenil, 46140 Parnac, France

[4] Laboratory for Analysis and Architecture of Systems (LAAS), Toulouse University, CNRS, INPT, Toulouse, France

[5] Department of Biodiversity and Environmental Management, Universidad de León, Campus de Ponferrada, 24401, Ponferrada, León, Spain

[6] BeeGuard SAS, Labège, France

Introduction

Nectar-foraging animals, such as bees, butterflies, birds, and bats, have evolved a rich cognitive repertoire for flower recognition (Healy and Hurly 2003; von Helversen and von Helversen 2003; Srinivasan 2010; Cepero et al. 2015). Bees, for instance, develop accurate visual memories of shapes, colors, and patterns to exploit the best rewarding flowers in their environment (Wehner 1967; Giurfa et al. 1999; Collett and Collett 2002; Dyer and Chittka 2004; Srinivasan 2006; Chittka and Raine 2006). Some of these information can last in memories for days or weeks (Chittka and Thomson 2001), allowing for flower specialization (i.e., flower constancy, Chittka et al. 1999). At the most basic level, foragers can discriminate flowers by learning associations between visual cues and a sugar reward or the absence of it (differential learning, Giurfa 2007). However, bees also exhibit some cognitive flexibility in order to update these learnt associations

and learn new ones, for instance, if the profitable plant species become unavailable and others start blooming (reversal learning, Raine and Chittka 2012). Consequently, we expect flexible visual associative learning and memory to be broadly observed across nectar-foraging species.

Wasps constitute a large group of Hymenopteran insects that is phylogenetically close to bees. Like bees, many species of wasps are generalists and frequently forage on floral nectar for carbohydrates (Richter 2000; Brock et al. 2021). Wasps are well known to use visual cues for place learning (Tinbergen 1932) and nestmate recognition (Sheehan and Tibbetts 2011). Recent studies using appetitive conditioning also reported their ability to learn pictures of human faces (Avarguès-Weber et al. 2018), patterns (D'Adamo and Lozada 2011), and colors (Balamurali et al. 2021). However, little is known about the ability of wasp foragers to exhibit flexibility in these visual learning, in order to update preferences with changes in resource quality and keep these information in memory for optimizing nectar-foraging trips, as reported in bees (Gegear and Thomson 2004).

To address this question, we investigated visual learning and memory in the two main hornet species found in Europe: the European hornet (*Vespa crabro*) and the invasive yellow-legged hornet (*Vespa velutina nigrithorax*). *Vespa crabro* is present in Europe for at least two centuries (Janet 1895), while *V. velutina* was first recorded in France in 2004 and spread across Western Europe (Monceau et al. 2014). Because these social hornets occasionally forage on flowers (Ueno 2015), we hypothesized that they should exhibit flexible visual learning. We tested this hypothesis by adapting visual appetitive conditioning protocols previously developed for bees (Howard et al. 2019), using a semi-automatic Y-maze in which hornets from captive nests could associate a colored light to a sucrose reward and another colored light to an absence of reward during 10 trials, after which the task was reversed. We measured all the hornets to test for a potential confounding effect of body size on learning performances recently reported in wasps and bees (van der Woude et al. 2018; Monchanin et al. 2021a). We also tested for a potential influence of inter-trial interval (Menzel et al. 2001).

Methods

Hornets

We caught wild nests of *V. crabro* (n=1) and *V. velutina* (n=3) in June–July 2022 (see details about collection sites and dates in Table S1). Colonies were in their developing phase (Monceau et al. 2014) and thus highly motivated to forage. We selected colonies that were comparable in size and number of individuals to make sure that they had similar nutritional needs and motivation. Once returned to the lab, we cooled the colonies in a cold chamber (4 °C) for 24 h and paint-marked all adults in each nest with a unique color code on their thorax and abdomen for individual identification. We then transferred the nests into plastic boxes (24 cm h × 32 cm l × 32 cm d (Fig. 1A)) kept in an experimental room at ambient temperature (20–22 °C). We provided hornets with ad libitum defrosted honeybees (source of proteins) and 40% (v/v) sucrose solution directly into the boxes. The colonies were tested in these controlled conditions one after the other within a 2-month period (see Table S1 for more details).

Y-maze

We connected the nest box to a homemade Y-maze using a clear transparent plastic tunnel (52 cm l, 2 cm Ø) with shutters to manually control the flux of foragers (see details in

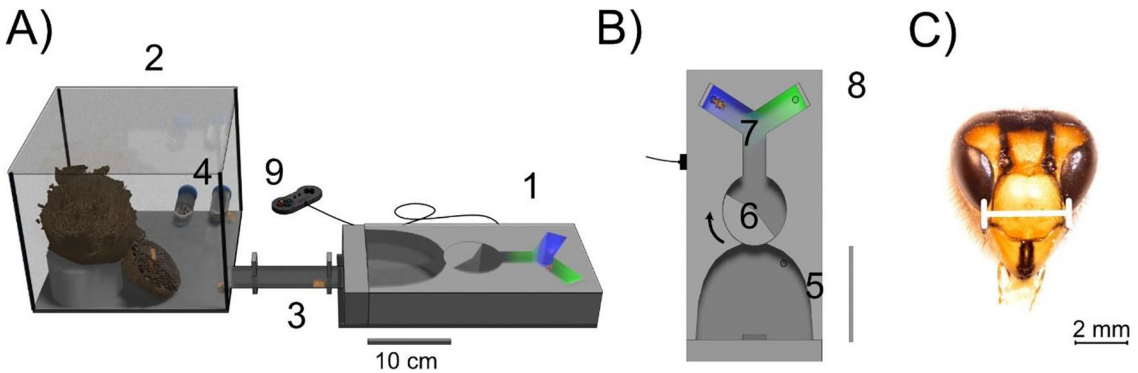


Fig. 1 **A** Overall view of the setup. **B** Detailed view of the Y-maze. (1) Y-maze connected to (2) nest box through a (3) tunnel with shutters. (4) Feeders containing ad libitum food (dead honeybees and sucrose solution). The Y-maze was dug in Styrofoam and covered with transparent plexiglass. (5) Pre-training feeder. (6) Turnstile entrance/exit door. (7) Feeding holes containing sucrose solution (positive reinforcement) or water (negative reinforcement) associated with (8) LED light displayed on the back wall (visual stimuli). (9) Turnstile and LEDs (on/off, change colors) were remote-controlled using a manual controller. **C** Head width measurement (white line)

Fig. 1B). Hornets could enter and exit the Y-maze through a turnstile door at the entrance. The first branch of the Y-maze led to two identical arms, each containing a feeding cup at its extremity. The feeding cup was a lidless transparent 0.2-ml Eppendorf inserted into the floor of the Y-maze. Depending on the training protocol, the feeding cup could contain sucrose solution, water, or nothing (see below). The back wall of each arm was illuminated by colored LEDs through a light diffuser (blue light: λ = 465–467 nm, intensity = 180–200 mcd; green light: λ = 522–525 nm, intensity = 660–720 mcd). Activation of the turnstile door and the LEDs was remote-controlled by the experimenter.

Pre-training

We pre-trained hornets to collect 40% (v/v) sucrose solution ad libitum on a feeding cup placed at the entrance of the Y-maze (Fig. 1B). During pre-training, shutters in the transparent tube connecting the colony to the Y-maze were left open so that hornets could visit the feeder ad libitum. We considered all hornets that made at least 3 visits to the feeder within 1 h of observation as regular foragers. Once one or several foragers were identified as regular, we removed the sucrose solution at the entrance to start training on these individuals.

Training

We trained 20 foragers of each species in two visual conditioning protocols routinely used to assess learning and memory in bees (Avarguès-Weber et al. 2011). Based on preliminary observations showing that hornets in this context preferred sucrose solution to water (i.e., we never observed water collection), we used sucrose solution as positive reinforcement and water as negative reinforcement. Water is commonly used by wasps for building nests and thermoregulation (Richter 2000). Since our colonies were maintained in a controlled temperate room, with only little population growth, it is likely that needs for water were reduced compared to field conditions. Each hornet was submitted to two training protocols immediately followed by a memory test. This was achieved on the same day (mean ± SE: 207.72 ± 63.23 min, range: 117–418 min).

Differential conditioning

We trained individual hornets to associate color A with a sucrose reward (positive-conditioned stimulus CS+) and color B with unrewarded water (negative-conditioned stimulus CS−) for 10 consecutive trials (Giurfa 2007). In differential conditioning, the conditioned stimuli are unambiguously associated with an unconditioned stimulus or with its absence. This protocol was used to evaluate the learning ability of hornets.

Reversal conditioning

Immediately after differential learning, we trained the same hornets to learn the opposite association, so that the sucrose reward (CS+) was paired to color B and water (CS−) to color A during 10 additional trials (Raine and Chittka 2012). In reversal conditioning, there is a transient ambiguity of stimulus outcome that needs to be overcome by the insect. This protocol was thus used to evaluate the cognitive flexibility of hornets.

At each trial of each learning protocol, CS+ and CS− were randomly assigned in the arms of the Y-maze. Hornets were free to come in the Y-maze when motivated, which means that the inter-trial interval was not controlled (n=800 inter-trials, mean ± SE: 7.35 ± 6.71 min, range: 1–116 min). We cleaned the Y-maze with 70% ethanol after each trial to remove any potential chemical marks left by the hornets.

For each hornet, we computed a learning score for differential learning and reversal learning by summing its first choices during the 10 trials (Monchanin et al. 2021b) (0: only CS−; 5: random; 10: only CS+). A trial began when the hornet entered the Y-maze by the turnstile entrance and ended when it collected the sucrose solution (in first or second choice). First choice was defined as the first feeding cup (CS+ or CS−) antennated by the hornets at each trial and was successful when it chooses CS+. For each protocol, we considered individuals that selected sucrose solution as their first choice for the last trial as "learners," as this is done in bee experiments (Buatois et al. 2017; Cabirol et al. 2018; Geng et al. 2022).

Memory retention

We tested short-term memory (STM) 1 h after the last trial of reversal learning using the same colors for CS+ and CS− as in reversal conditioning. This analysis was conducted only for motivated learners. The trained hornets were allowed to re-enter the Y-maze and choose between the two visual stimuli without any sucrose or water. We considered that the hornet memorized the association when it chose the arm colored as CS+ and antennated the empty feeding cup.

Morphometry

To control for a potential influence of head size on the learning and memory performances of hornets, we froze-killed the conditioned hornets and made morphological measurements with the ToupView software coupled to a Nikon SMZ 745T dissecting microscope (objective ×0.67) with a ToupCam camera model U3CMOS. We measured head width as a proxy of head size (Riveros and Gronenberg 2010). Note that 4 out of the 20 *V. crabro* were physically damaged and removed from these analyses.

Statistics

We analyzed the data in R 4.0.4. From the raw data (available in Dataset S1 and S2), we extracted the first choice of each hornet at each trial (CS+: 1, CS−: 0) of differential and reversal conditioning. We then tested the influence of species (*V. crabro* or *V. velutina*) and trials 1–10 on first choice (CS+), using a generalized linear mixed model (GLMM; R package lme4, Bates et al. 2015), with binomial error structure and identity as a random factor, followed by an ANOVA (R package car, Fox and Weisberg 2019). For each conditioning protocol, we compared the number of learners in the two species using a chi-square test with a continuity correction (R function chisq.test). We analyzed the effect of head width and inter-trial interval on learning scores (0–10) using a linear mixed model (R package lme4) with the colony as a random factor for *V. velutina* and a linear model for *V. crabro* as we tested only one colony for this species.

Results

We first assessed the learning performances of hornets in a differential learning task in which one color was rewarded and the other was not (Fig. 2A). The percentage of individuals that correctly chose the reward increased with the number of trials (Binomial GLMM, trial: X^2=43.53, df=9, p<0.001), and this was similar in the two species (Binomial GLMM, species: X^2=2.26, df=1, p=0.133). The proportion of learners was maximal and identical in *V. velutina* and *V. crabro* (100%, 20/20 of hornets in each species).

We then measured the cognitive flexibility of the learners in a reversal learning task where the previously learnt reward-color associations were inversed (Fig. 2B). Here again the proportion of hornets that chose the rewarded stimulus increased with the number of trials (Binomial GLMM, trial: X^2=0.53, df=9, p<0.001), and this was similar in the two species (Binomial GLMM, species: X^2=0.59, df=1, p=0.407). The proportion of learners was also comparable in *V. velutina* (65%, 13/20 hornets) and *V. crabro* (70%, 14/20

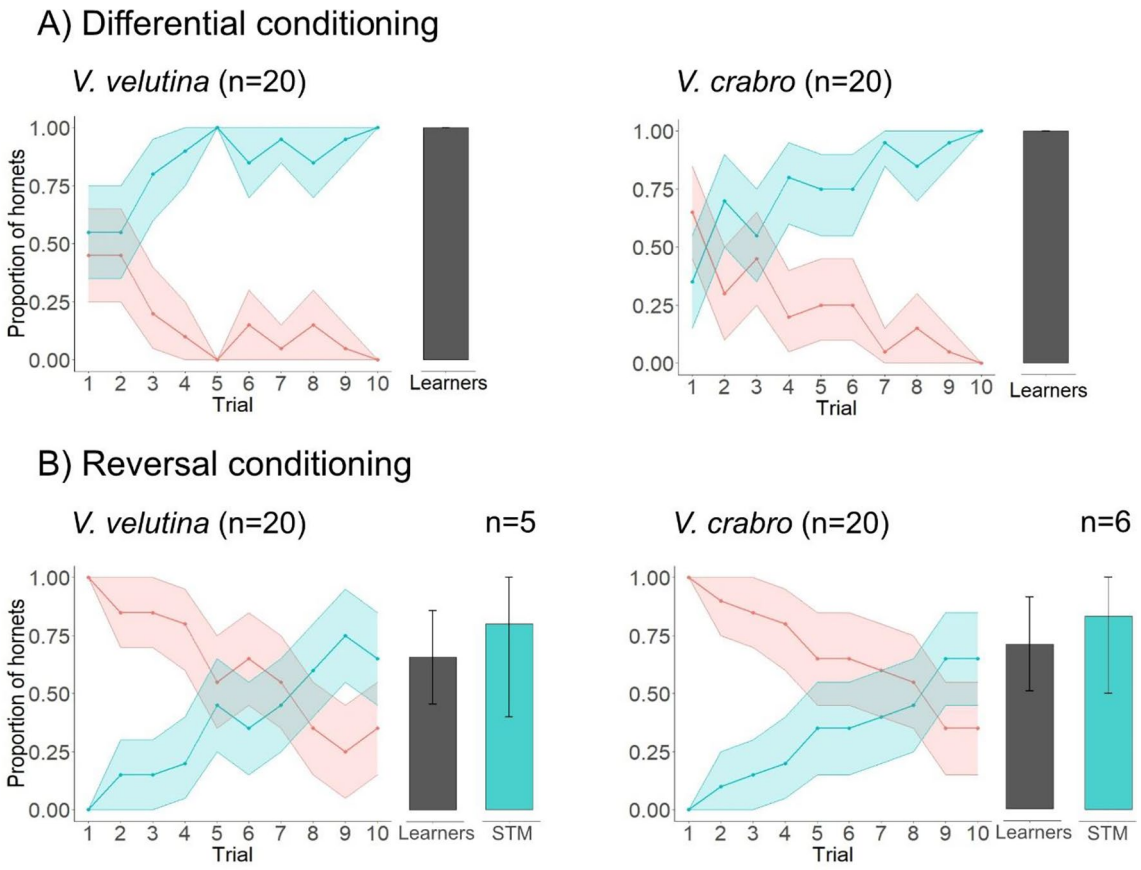


Fig. 2 Learning curves for differential (**A**) and reversal (**B**) conditioning of *V. velutina* and *V. crabro*. Blue: responses to CS+. Red: responses to CS−. Learners: percentage of hornets that responded to CS+ in the last trial. STM: short-term memory test. Error bars are 95% confidence intervals

hornets) (X^2<0.001, *df*=1, *p*=1). However, these proportions were lower than for differential learning, indicating that overcoming the transient ambiguity of the stimuli following the reversal of contingencies was complex.

For both species, most of the learners developed a short-term memory of the color-reward association when tested 1 h after the reversal learning phase (*V. velutina*: 80%, *n*=4/5; *V. crabro*: 83%, *n*=5/6). Here, however, our sample size was too small to test for statistical differences between species.

When looking for potential confounding factors, we found important variation in head size (*V. velutina*: mean+SE: 3.37± 0.13 mm, range: 3.12–3.54 mm, *n*= 20; *V. crabro*: 3.86 ± 0.19 mm, range: 3.33–4.07, *n*= 20) and inter-trial intervals (*V. velutina*: differential learning: mean ± SE: 9.36 ± 3.83 min, range: 5.6–21.9 min, reversal learning: 8.03 ± 3.47 min, range: 2.6–13.8 min; *V. crabro*: differential learning: 6.09 ± 1.18 min, range: 4.1–8.5 min, reversal learning: 5.42 ± 1.84 min, range: 3.5–11.2 min) across hornets. However, none of these parameters had a significant influence on the learning scores (LMM differential learning: *V. velutina*: head width: X^2=3.21, *df*=1, *p*=0.073, inter-trial interval: X^2=0.0002, *df*=1, *p*=0.988; *V. crabro*: head width: X^2=6.09, *df*=1, *p*=0.149, inter-trial interval: X^2=1.42, *df*=1, *p*=0.472; LMM reversal learning: *V. velutina*: head width: X^2=0.89, *df*=1, *p*=0.344, inter-trial interval: X^2=0.71, *df*=1, *p*=0.398; *V. crabro*: head width: X^2=4.25, *df*=1, *p*=0.353, inter-trial interval: X^2=0.007, *df*=1, *p*=0.969).

Discussion

We adapted appetitive conditioning protocols used in bee research (Avarguès-Weber et al. 2011) to explore and compare flexible visual cognition in nectar-foraging hornets. Foragers of European and yellow-legged hornets' species learned equally well the visual-color associations in differential and reversal conditioning and remembered these associations for at least 1 h. This suggests that these forms of visual learning and cognitive flexibility are widespread among flower-foraging animals.

Wasps are known to use visual cues in navigation (Tinbergen 1932; Beier and Menzel 1972; D'adamo and Lozada 2003; D'Adamo and Lozada 2011) and communication (Sheehan and Tibbetts 2011; Baracchi et al. 2015; Avarguès-Weber et al. 2018). However, the importance of visual learning and memory in flower selection is less clear (Balamurali et al. 2021). While experimental conditions are not identical but only similar, the hornet visual associative performances were comparable to or higher than that of bees (Giurfa 2004; Strang and Sherry 2014). Like nectar-foraging bees, *V. velutina* and *V. crabro* foragers can learn to associate colors with sucrose rewards and store these associations. This memory of color-reward association likely supports flower constancy, a behavior recently described in hornets (Ueno 2015) and known to improve foraging success in bees (Gegear and Thomson 2004). Importantly, the hornets were also capable of quickly replacing the learnt associations with new ones, indicating that they can adjust their flower preferences to natural fluctuations of flower reward values through time, over the course of their foraging career. Such behavioral flexibility at the individual level may be critical for foragers to adapt nutrient collection to changing colony needs, depending on variations in colony composition (e.g., adult-to-larvae ratio) or external conditions (e.g., ambient temperature) (Simpson et al. 2014).

The fact that we did not detect the difference in the performances of *V. crabro* and *V. velutina* suggests that the cognitive traits we studied are basic abilities shared across nectar-foraging species, irrespective of differences in their morphology (e.g., body size) and invasion history. Y-maze conditioning is a simple, yet powerful, approach for further comparative analyses of the cognitive capacities of insect pollinators. Future studies using this approach in non-model species could explore more the elaborated forms of visual learning such as non-elemental associative learning (Giurfa et al. 2001) or bimodal visual-olfactory learning (Zhang et al. 2014) described in honey bees and bumblebees. In the case of *V. velutina*, a detailed understanding of their cognitive abilities may help better predict their spreading dynamics (e.g., in relation to food type and abundance) or develop new tools for biocontrol of invasive populations in Europe and Western Asia. For instance, visual conditioning could be used to attract hornets into traps or to feed them on contaminated baits that could act as a Trojan horse (Poidatz et al. 2018). Ultimately, comparing cognitive abilities across phylogenetically close species using standard, replicable tests is critical to understand the ecological drivers of the evolution of cognitive traits.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00265-023-03349-z.

Acknowledgements We thank Stephane Kraus for helping to produce Fig. 1A, B.

Author contribution MLa, DT, and MLi designed the study. EN and CL built the Y-maze. MLa performed the experiments and wrote the first draft. MDB, NR, and ZT participated to the experiments. All authors revised the manuscript.

Funding This work was supported by grants from the French Agency for Ecological Transition (ADEME n°2082C0061) to M2i and the European Commission (FEDER project ECONECT) to MLi. MLa received support from a PhD Fellowship from the French National Association for Research and Technology (ANRT).

Data availability All data generated or analyzed during this study are included in this published article (supplementary Table S1, Dataset S1, Dataset S2).

Declarations

Competing interests The authors declare no competing interests. M2i and BeeGuard did not influence the analysis and the conclusions.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

Avarguès-Weber A, Deisig N, Giurfa M (2011) Visual cognition in social insects. Annu Rev Entomol 56:423–443. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144855

Avarguès-Weber A, d'Amaro D, Metzler M et al (2018) Does holistic processing require a large brain? Insights from honeybees and wasps in fine visual recognition tasks. Front Psychol 9:1313. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.01313

Balamurali GS, Reshnuraj RS, Johnson J et al (2021) Visual associative learning and olfactory preferences of the greater banded hornet, *Vespa tropica*. Insect Soc 68:217–226. https://doi.org/10.1007/s00040-021-00820-w

Baracchi D, Petrocelli I, Chittka L et al (2015) Speed and accuracy in nest-mate recognition: a hover wasp prioritizes face recognition over colony odour cues to minimize intrusion by outsiders. Proc R Soc B 282:20142750. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2750

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. J Stat Softw 67(1):1–48. https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01

Beier WV, Menzel R (1972) Untersuchungen über den farbensinn der deutschen wespe (*Paravespula germanica F.*, Hymenoptera, Vespidae): Verhaltensphysiologischer nachweis des farbensehens. Zool Jb Physiol 76:441–454

Boitard C, Devaud J-M, Isabel G, Giurfa M (2015) GABAergic feedback signaling into the calyces of the mushroom bodies enables olfactory reversal learning in honey bees. Front Behav Neurosci 9:198

Brock RE, Cini A, Sumner S (2021) Ecosystem services provided by aculeate wasps. Biol Rev 96:1645–1675. https://doi.org/10.1111/brv.12719

Buatois A, Pichot C, Schultheiss P et al (2017) Associative visual learning by tethered bees in a controlled visual environment. Sci Rep 7:12903. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12631-w

Cabirol A, Cope AJ, Barron AB, Devaud J-M (2018) Relationship between brain plasticity, learning and foraging performance in honey bees. PLoS One 13:e0196749. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196749

Cepero LC, Rosenwald LC, Weiss MR (2015) The relative importance of flower color and shape for the foraging monarch butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae). J Insect Behav 28:499–511. https://doi.org/10.1007/s10905-015-9519-z

Chittka L, Raine NE (2006) Recognition of flowers by pollinators. Curr Opin Plant Biol 9:428–435. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.002

Chittka L, Thomson JD (2001) Cognitive ecology of pollination: animal behaviour and floral evolution. Cambridge University Press

Chittka L, Thomson JD, Waser NM (1999) Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. Naturwissenschaften 86:361–377. https://doi.org/10.1007/s001140050636

Collett TS, Collett M (2002) Memory use in insect visual navigation. Nat Rev Neurosci 3:542–552. https://doi.org/10.1038/nrn872

D'adamo P, Lozada M (2003) The importance of location and visual cues during foraging in the German wasp (*Vespula germanica* F.) (Hymenoptera: Vespidae). New Zeal J Zool 30:171–174. https://doi.org/10.1080/03014223.2003.9518336

D'Adamo P, Lozada M (2011) Cognitive plasticity in foraging *Vespula germanica* wasps. J Insect Sci 11:103

Dyer AG, Chittka L (2004) Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. Naturwissenschaften 91:224–227. https://doi.org/10.1007/s00114-004-0508-x

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

Gegear RJ, Thomson JD (2004) Does the flower constancy of bumble bees reflect foraging economics? Ethology 110:793–805. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2004.01010.x

Geng H, Lafon G, Avarguès-Weber A et al (2022) Visual learning in a virtual reality environment upregulates immediate early gene expression in the mushroom bodies of honey bees. Commun Biol 5:1–11. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03075-8

Giurfa M (2004) Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. Naturwissenschaften 91:228–231. https://doi.org/10.1007/s00114-004-0530-z

Giurfa M (2007) Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. J Comp Physiol A 193:801–824. https://doi.org/10.1007/s00359-007-0235-9

Giurfa M, Hammer M, Stach S et al (1999) Pattern learning by honeybees: conditioning procedure and recognition strategy. Anim Behav 57:315–324. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0957

Giurfa M, Zhang S, Jenett A et al (2001) The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. Nature 410:930–933. https://doi.org/10.1038/35073582

Healy S, Hurly T (2003) Cognitive ecology: foraging in hummingbirds as a model system, Advances in the Study of Behavior. Elsevier, pp 325–359

Howard SR, Avarguès-Weber A, Garcia JE et al (2019) Numerical cognition in honeybees enables addition and subtraction. Sci Adv 5:eaav0961. https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0961

Janet C (1895) Etudes sur les fourmis, les guêpes et les abeilles. Note 9: sur *Vespa crabro* L. Histoire d'un nid depuis son origine. Mémoire de la Société Zoologique de France 8:1–140

Menzel R, Manz G, Menzel R, Greggers U (2001) Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the Intertrial Interval, and the Test Interval. Learn Mem 8:198–208. https://doi.org/10.1101/lm.40001

Monceau K, Bonnard O, Thiéry D (2014) Vespa velutina: a new invasive predator of honeybees in Europe. J Pest Sci 87:1–16. https://doi.org/10.1007/s10340-013-0537-3

Monchanin C, Blanc-Brude A, Drujont E et al (2021a) Chronic exposure to trace lead impairs honey bee learning. Ecotox Environ Safe 212:112008. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112008

Monchanin C, Drujont E, Devaud J-M et al (2021b) Metal pollutants have additive negative effects on honey bee cognition. J Exp Biol 224:jeb241869. https://doi.org/10.1242/jeb.241869

Mota T, Giurfa M (2010) Multiple reversal olfactory learning in honeybees. Front Behav Neurosci 4:48. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00048

Poidatz J, López Plantey R, Thiéry D (2018) Indigenous strains of Beauveria and Metharizium as potential biological control agents against the invasive hornet Vespa velutina. J Invertebr Pathol 153:180–185. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.021

Raine NE, Chittka L (2012) No trade-off between learning speed and associative flexibility in bumblebees: a reversal learning test with multiple colonies. PLoS One 7:e45096. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045096

Richter MR (2000) Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. Annu Rev Entomol 45:121–150. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.121

Riveros AJ, Gronenberg W (2010) Brain allometry and neural plasticity in the bumblebee *Bombus occidentalis*. Brain Behav Evolut 75:138–148. https://doi.org/10.1159/000306506

Sheehan MJ, Tibbetts EA (2011) Specialized face learning is associated with individual recognition in paper wasps. Science 334:1272–1275. https://doi.org/10.1126/science.1211334

Simpson S, Clissold F, Lihoreau M et al (2014) Recent advances in the integrative nutrition of arthropods. Annu Rev Entomol 60:293–311. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020917

Srinivasan MV (2006) Honeybee vision: in good shape for shape recognition. Curr Biol 16:R58–R60. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.002

Srinivasan MV (2010) Honey bees as a model for vision, perception, and cognition. Annu Rev Entomol 55:267–284. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.010908.164537

Strang CG, Sherry DF (2014) Serial reversal learning in bumblebees (*Bombus impatiens*). Anim Cogn 17:723–734. https://doi.org/10.1007/s10071-013-0704-1

Tinbergen N (1932) The animal in its world : explorations of an ethologist. Harvard University Press

Ueno T (2015) Flower-visiting by the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae). Int J Chem Environ Biol Sci 3:444–448

van der Woude E, Huigens ME, Smid HM (2018) Differential effects of brain size on memory performance in parasitic wasps. Anim Behav 141:57–66. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.05.011

von Helversen D, von Helversen O (2003) Object recognition by echolocation: a nectar-feeding bat exploiting the flowers of a rain forest vine. J Comp Physiol A 189:327–336. https://doi.org/10.1007/s00359-003-0405-3

Wehner R (1967) Pattern recognition in bees. Nature 215:1244–1248. https://doi.org/10.1038/2151244a0

Zhang L-Z, Zhang S-W, Wang Z-L et al (2014) Cross-modal interaction between visual and olfactory learning in *Apis cerana*. J Comp Physiol A 200:899–909. https://doi.org/10.1007/s00359-014-0934-y

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ANNEXE 4 : RESULTATS STATISTIQUES DES TESTS DE PROPORTIONS DE CAPTURES

Annotation de gauche à droite et de bas en haut :

Numéro du site
Total : Nombre de captures totales dans le piège 1 et 2
Max : Nombre de captures maximales dans le piège gagnant
Gagn : Numéro du piège gagnant
ICl : Borne inférieure de l' intervalle de confiance
ICu : Borne supérieure de l' intervalle de confiance
p : p-valeur du relevé
Numéro de relevé
p.value : p-valeur du site

Expérience 1 : Deux pièges identiques

Résultats de tests par caste, relevés et par site

1) Fondatrices de frelons asiatiques et européens :

Site 1

	Total	Max	Gagn	ICl	ICu	p
1	39	23	2	0.45	1	0.1683918
2	8	4	1	0.19	1	0.6367188
3	38	21	1	0.41	1	0.3135513

p.value = 0.6419559

Site 2

	Total	Max	Gagn	ICl	ICu	p
1	3	3	1	0.37	1	0.1250
2	3	2	1	0.14	1	0.5000
3	5	4	1	0.34	1	0.1875

p.value = 0.1622902

Site 3

```
  Total Max Gagn  ICl ICu          p
1    12   9    2 0.47   1 0.07299805
2    11   8    1 0.44   1 0.11328125
3    19  12    1 0.42   1 0.17964172

                    p.value =  0.08623623


-------------
 Site 4
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1    27  16    1 0.42   1 0.221034169
2    27  15    2 0.38   1 0.350554019
3    41  26    2 0.49   1 0.058637603
4    14  12    2 0.61   1 0.006469727

                    p.value =  0.02286726


-------------
 Site 5
  Total Max Gagn  ICl ICu         p
1     4   3    1 0.25   1 0.3125000
2     1   1    1 0.05   1 0.5000000
3     4   3    1 0.25   1 0.3125000
4    10   8    2 0.49   1 0.0546875

                    p.value =  0.1585976


-------------
 Site 6
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1    20  18    2 0.72   1 0.0002012253
2     4   3    2 0.25   1 0.3125000000
3     8   5    1 0.29   1 0.3632812500
4     6   4    1 0.27   1 0.3437500000
5     6   5    2 0.42   1 0.1093750000
6    11   6    2 0.27   1 0.5000000000

                    p.value =  0.006959576


-------------
 Site 7
  Total Max Gagn  ICl ICu         p
1     6   3    1 0.15   1 0.6562500
2     3   2    1 0.14   1 0.5000000
3    15   8    2 0.30   1 0.5000000
4     7   5    1 0.34   1 0.2265625
```

```
                    p.value =  0.793311


-------------
 Site 8
  Total Max Gagn  ICl ICu        p
1     6   5    2 0.42   1 0.109375
2     1   1    2 0.05   1 0.500000
3     3   3    2 0.37   1 0.125000

                    p.value =  0.08331631


-------------
 Site 9
  Total Max Gagn  ICl ICu         p
1     3   3    1 0.37   1 0.1250000
2    10   6    1 0.30   1 0.3769531

                    p.value =  0.4883775


-------------
 Site 10
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1     6   4    1 0.27   1 0.343750000
2    10   7    1 0.39   1 0.171875000
3    42  32    1 0.63   1 0.000470337

                    p.value =  0.003204678


-------------
 Site 11
  Total Max Gagn  ICl ICu    p
1     2   1    1 0.03   1 0.75
2     2   2    2 0.22   1 0.25

                    p.value =  0.6065307


-------------
 Site 12
  Total Max Gagn  ICl ICu          p
1    20  13    2 0.44   1 0.13158798
2    24  17    2 0.52   1 0.03195733
3    37  21    1 0.42   1 0.25568789

                    p.value =  0.08421477
```

```
-------------
 Site 13
  Total Max Gagn  ICl ICu    p
1     2   2    1 0.22   1 0.25
2     1   1    1 0.05   1 0.50

                    p.value =  0.7788008


-------------
 Site 14
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1    26  14    1 0.36   1 0.4225094914
2    19  13    1 0.47   1 0.0835342407
3    31  25    1 0.65   1 0.0004389551
4     5   4    1 0.34   1 0.1875000000

                    p.value =  0.002789438


-------------
 Site 15
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1    36  33    2 0.80   1 1.136068e-07
2    19  16    2 0.64   1 2.212524e-03
3    21  21    2 0.87   1 4.768372e-07
4     9   9    2 0.72   1 1.953125e-03
5     6   6    2 0.61   1 1.562500e-02
6    22  19    2 0.68   1 4.277229e-04

                    p.value =  1.724256e-15
```

2) Ouvrières de frelons asiatiques et européens :

```
Site 1
   Total Max Gagn  ICl ICu           p
1     39  23    2 0.45   1 1.683918e-01
2      8   4    1 0.19   1 6.367188e-01
3     38  21    1 0.41   1 3.135513e-01
4     90  51    1 0.47   1 1.230532e-01
5     93  63    2 0.59   1 4.050044e-04
6    126  78    2 0.54   1 4.751583e-03
7    181 118    2 0.59   1 2.642507e-05
8     86  45    1 0.43   1 3.732672e-01
9    159  80    2 0.44   1 5.000000e-01
10   123  69    2 0.48   1 1.033236e-01

                    p.value =  1.192567e-05


-------------
 Site 2
   Total Max Gagn  ICl ICu          p
1      3   3    1 0.37   1 0.12500000
2      3   2    1 0.14   1 0.50000000
3      5   4    1 0.34   1 0.18750000
4     32  20    2 0.46   1 0.10766357
5     40  21    1 0.38   1 0.43731466
6     25  14    2 0.38   1 0.34501898
7     25  14    2 0.38   1 0.34501898
8     45  26    1 0.44   1 0.18564902
9     21  14    2 0.46   1 0.09462357
10    47  25    1 0.40   1 0.38543350

                    p.value =  0.3150766


-------------
 Site 3
   Total Max Gagn  ICl ICu           p
1     12   9    2 0.47   1 0.0729980469
2     11   8    1 0.44   1 0.1132812500
3     19  12    1 0.42   1 0.1796417236
4     74  52    1 0.60   1 0.0003214037
5     65  45    1 0.59   1 0.0013131884
6     77  40    2 0.42   1 0.4099464519
7    164  84    1 0.45   1 0.4074353907
8    102  52    2 0.42   1 0.4605955246
9    104  55    2 0.44   1 0.3120717579
10    92  52    2 0.47   1 0.1256610517

                    p.value =  0.0007009756
```

```
-------------
 Site 4
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1    27  16    1 0.42   1 0.221034169
2    27  15    2 0.38   1 0.350554019
3    41  26    2 0.49   1 0.058637603
4    14  12    2 0.61   1 0.006469727
5   145  73    1 0.43   1 0.500000000
6   141  79    1 0.49   1 0.088814918
7   140  74    2 0.46   1 0.277134458
8   127  79    1 0.55   1 0.003759798

                    p.value =  0.006079786


-------------
 Site 5
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1     4   3    1 0.25   1 3.125000e-01
2     1   1    1 0.05   1 5.000000e-01
3     4   3    1 0.25   1 3.125000e-01
4    10   8    2 0.49   1 5.468750e-02
5    65  50    1 0.67   1 7.858515e-06
6    76  39    2 0.41   1 4.543885e-01
7    66  45    1 0.58   1 2.136203e-03
8    96  53    1 0.46   1 1.791988e-01
9   149  95    1 0.57   1 4.916666e-04

                    p.value =  4.760252e-07


-------------
 Site 6
   Total Max Gagn  ICl ICu            p
1     20  18    2 0.72   1 0.0002012253
2      4   3    2 0.25   1 0.3125000000
3      8   5    1 0.29   1 0.3632812500
4      6   4    1 0.27   1 0.3437500000
5      6   5    2 0.42   1 0.1093750000
6     11   6    2 0.27   1 0.5000000000
7     15   8    2 0.30   1 0.5000000000
8     37  20    1 0.39   1 0.3714146794
9     54  31    1 0.45   1 0.1704454706
10   101  51    2 0.42   1 0.5000000000
11   283 162    1 0.52   1 0.0086320759
12   225 137    1 0.55   1 0.0006610635
13   288 162    2 0.51   1 0.0194925190
14   316 171    1 0.49   1 0.0797549255

                    p.value =  0.000103728
```

```
-------------
 Site 7
  Total Max Gagn  ICl ICu          p
1     6   3    1 0.15   1 0.65625000
2     3   2    1 0.14   1 0.50000000
3    15   8    2 0.30   1 0.50000000
4     7   5    1 0.34   1 0.22656250
5   140  77    1 0.48   1 0.13592102
6   195 105    2 0.48   1 0.15803656
7   152  87    1 0.50   1 0.04408732
8   143  72    1 0.43   1 0.50000000

                    p.value =  0.4909474


-------------
 Site 8
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1     6   5    2 0.42   1 0.1093750000
2     1   1    2 0.05   1 0.5000000000
3     3   3    2 0.37   1 0.1250000000
4   124  67    2 0.46   1 0.2095368713
5   196 126    2 0.58   1 0.0000385253
6   210 123    2 0.53   1 0.0077622746
7   132  83    1 0.55   1 0.0019525609
8   220 111    2 0.45   1 0.4731338639

                    p.value =  6.294729e-06


-------------
 Site 9
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1     3   3    1 0.37   1 1.250000e-01
2    10   6    1 0.30   1 3.769531e-01
3   110  57    2 0.44   1 3.875015e-01
4   207 109    1 0.47   1 2.435585e-01
5   294 181    1 0.57   1 4.361288e-05

                    p.value =  0.001328835


-------------
 Site 10
   Total Max Gagn  ICl ICu            p
1      6   4    1 0.27   1 3.437500e-01
2     10   7    1 0.39   1 1.718750e-01
3     42  32    1 0.63   1 4.703370e-04
4     71  39    2 0.44   1 2.383439e-01
5     76  56    2 0.64   1 2.184466e-05
```

```
6     47  33     2 0.57    1 3.971363e-03
7     60  39     2 0.54    1 1.367007e-02
8     90  52     2 0.49    1 8.512120e-02
9    121  62     1 0.43    1 4.279108e-01
10   154  81     2 0.46    1 2.864230e-01

                    p.value =  8.390849e-07


-------------
 Site 11
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1     2   1     1 0.03    1 0.750000000
2     2   2     2 0.22    1 0.250000000
3    68  35     1 0.41    1 0.451798673
4   103  59     2 0.49    1 0.083722167
5   102  66     2 0.56    1 0.001932792
6    46  27     2 0.46    1 0.150997807
7    59  31     2 0.41    1 0.397421827
8    44  25     2 0.43    1 0.225690416
9    47  27     2 0.44    1 0.190846699

                    p.value =  0.05766662


-------------
 Site 12
   Total Max Gagn  ICl ICu           p
1     20  13     2 0.44    1 1.315880e-01
2     24  17     2 0.52    1 3.195733e-02
3     37  21     1 0.42    1 2.556879e-01
4    148  76     1 0.44    1 4.026605e-01
5    128  75     1 0.51    1 3.150439e-02
6    155 107     1 0.62    1 1.218359e-06
7    146 100     1 0.62    1 4.618423e-06
8     64  44     1 0.58    1 1.844982e-03
9     95  60     1 0.54    1 6.689352e-03
10   116  77     1 0.58    1 2.670473e-04

                    p.value =  3.211128e-13


-------------
 Site 13
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1     2   2     1 0.22    1 0.2500000000
2     1   1     1 0.05    1 0.5000000000
3   128  65     2 0.43    1 0.4648069539
4   198 124     2 0.57    1 0.0002335427
5    74  44     2 0.49    1 0.0650888402
6   156  92     2 0.52    1 0.0151551578
```

```
7   211 118    2 0.50   1 0.0491289306

                    p.value =  0.0004462483


-------------
 Site 14
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1    26  14    1 0.36   1 4.225095e-01
2    19  13    1 0.47   1 8.353424e-02
3    31  25    1 0.65   1 4.389551e-04
4     5   4    1 0.34   1 1.875000e-01
5    54  43    1 0.69   1 7.006529e-06
6   111  60    1 0.46   1 2.239031e-01
7   134  81    2 0.53   1 9.668424e-03
8   137  74    2 0.47   1 1.964938e-01

                    p.value =  1.042593e-06


-------------
 Site 15
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1    36  33    2 0.80   1 1.136068e-07
2    19  16    2 0.64   1 2.212524e-03
3    21  21    2 0.87   1 4.768372e-07
4     9   9    2 0.72   1 1.953125e-03
5     6   6    2 0.61   1 1.562500e-02
6    22  19    2 0.68   1 4.277229e-04
7    16  11    2 0.45   1 1.050568e-01
8    86  62    2 0.63   1 2.541827e-05
9    90  74    2 0.74   1 2.192892e-10

                    p.value =  2.733222e-25


-------------
 Site 16
  Total Max Gagn  ICl ICu         p
1    97  52    2 0.45   1 0.2713051

                    p.value =  0.5423868


-------------
 Site 17
  Total Max Gagn ICl ICu         p
1    54  28    2 0.4   1 0.4459616

                    p.value =  0.8917559
```

```
-------------
 Site 18
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1    64  56    1 0.79   1 2.781336e-10
2   106  66    1 0.54   1 7.389705e-03

                    p.value =  1.67756e-09


-------------
 Site 19
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1    44  23    1 0.39   1 0.440197911
2    59  30    1 0.39   1 0.500000000
3   161  85    2 0.46   1 0.264252841
4   297 180    1 0.56   1 0.000153185

                    p.value =  0.007376564


-------------
 Site 20
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1   265 137    2 0.46   1 0.3116007664
2   533 305    1 0.54   1 0.0004885732

                    p.value =  0.0039299


-------------
 Site 21
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1   210 108    1 0.46   1 3.650806e-01
2   234 148    2 0.58   1 3.043734e-05
3   313 159    2 0.46   1 4.105867e-01

                    p.value =  0.0008228461


-------------
 Site 22
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1   154 102    1 0.59   1 3.432617e-05
2   237 162    1 0.63   1 8.085118e-09
3   176 108    1 0.55   1 1.585984e-03

                    p.value =  2.260031e-12


-------------
```

```
 Site 23
  Total Max Gagn  ICl ICu         p
1    36  22    1 0.46   1 0.1214925

                    p.value =  0.243345


-------------
 Site 24
  Total Max Gagn  ICl ICu          p
1    24  18    2 0.57   1 0.01132792

                    p.value =  0.02474467


-------------
 Site 25
  Total Max Gagn  ICl ICu         p
1    93  52    2 0.47   1 0.1498658

                    p.value =  0.2997584


-------------
 Site 26
  Total Max Gagn  ICl ICu         p
1    80  43    2 0.44   1 0.2882153

                    p.value =  0.5761501


-------------
 Site 27
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1   127  76    1 0.52   1 1.639478e-02
2   173 102    1 0.52   1 1.114117e-02
3   269 178    1 0.61   1 6.175388e-08

                    p.value =  2.095501e-08


-------------
 Site 28
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1   147  85    1 0.51   1 0.034616254
2   203 117    1 0.52   1 0.017490655
3   355 206    1 0.54   1 0.001452168

                    p.value =  0.000561691

-------------
```

```
 Site 29
  Total Max Gagn  ICl ICu        p
1     6   5    2 0.42   1 0.109375

                     p.value =  0.2206714

-------------
 Site 30
  Total Max Gagn  ICl ICu   p
1    13   7    1 0.29   1 0.5

                     p.value =  1
```

Expérience 2 : Un des deux pièges est amorcé

Résultats de tests par relevés et par site

Ouvrières de frelons asiatiques et européens

```
-------------
 Site 5
  Total Max Gagn  ICl ICu          p
1   214 117    1 0.49   1 0.09694472

                 p.value =  0.194008


-------------
 Site 16
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1   104  52    1 0.42   1 0.539025586
2   139  83    1 0.52   1 0.013536765
3   168 100    1 0.53   1 0.008256708
4   253 134    2 0.48   1 0.189401067

                 p.value =  0.01572602


-------------
 Site 17
  Total Max Gagn  ICl ICu          p
1    68  43    2 0.53   1 0.01923003
2    48  27    1 0.43   1 0.23543951
3   123  65    1 0.45   1 0.29434403

                 p.value =  0.1159165
-------------
 Site 18
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1    74  58    1 0.69   1 4.837446e-07

                 p.value =  1.877765e-06


-------------
 Site 19
  Total Max Gagn  ICl ICu            p
1   323 202    1 0.58   1 3.848915e-06

                 p.value =  8.534442e-06


-------------
 Site 20
  Total Max Gagn  ICl ICu          p
1   449 231    1 0.47   1 0.2856142
```

```
                  p.value =  0.5711797


-------------
 Site 25
  Total Max Gagn  ICl ICu           p
1   132  88    1 0.59   1 8.011767e-05
2    90  49    2 0.45   1 2.303962e-01
3   175 104    1 0.53   1 7.662119e-03
4   109  68    1 0.54   1 6.201819e-03

                  p.value =  1.090023e-05


-------------
 Site 26
  Total Max Gagn  ICl ICu          p
1    87  44    1 0.41   1 0.50000000
2    94  53    1 0.47   1 0.12822117
3    90  49    2 0.45   1 0.23039624
4    84  49    1 0.49   1 0.07782823

                  p.value =  0.332257
```

ANNEXE 5 : RESULTATS STATISTIQUES SUPPLÉMENTAIRES DU SOUS-CHAPITRE 4.2

Tableau 11
Détails des résultats statistiques du modèle linéaire (LMM) obtenus dans le sous-chapitre 4.2. Analyse de la durée de toilettage en fonction du traitement reçu et du jour post infection. C : contrôle, I : infecté, 1 : 24h post-infection, 2 : 48h post-infection, 3 : 72h post infection.

Comparaison	df	t	p
C1 - I1	11,6	-3,676	0,026
C1 - C2	101,1	0,764	0,973
C1 - I2	57,5	-1,805	0,471
C1 - C3	104	1,481	0,677
C1 - I3	53,6	-1,249	0,811
I1 - C2	57,6	2,984	0,046
I1 - I2	101,1	0,764	0,973
I1 - C3	58,1	3,536	0,01
I1 - I3	104	1,481	0,677
C2 - I2	11,6	-3,767	0,026
C2 - C3	104	0,718	0,979
C2 - I3	53,6	-1,838	0,451
I2 - C3	58,1	2,947	0,056
I2 - I3	104	0,718	0,979
C3 - I3	11,6	-3,767	0,026

ANNEXE 6 : EXPÉRIENCE PRÉLIMINAIRE DE SURVIE DE BOURDONS EXPOSÉS A DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE *METARHIZIUM*

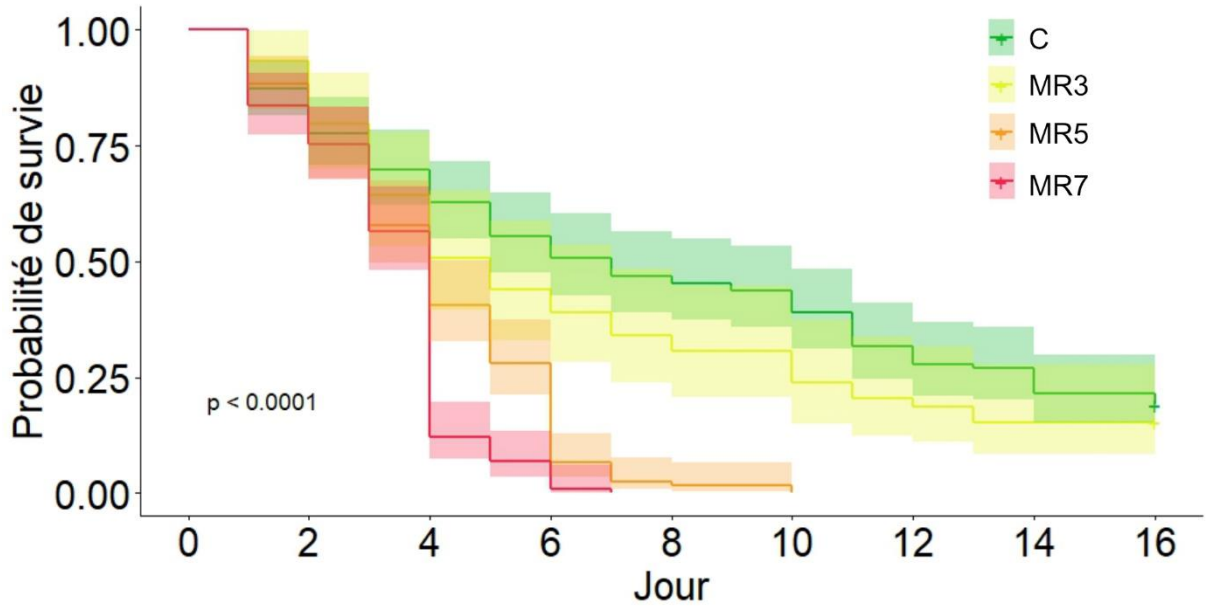


Figure 45

Probabilité de survie de bourdons dans les 16 jours qui suivent une exposition à différentes concentrations à *M. robertsii*. Nous avons exposé les bourdons à un traitement puis nous les avons regroupés en microcolonie (de 10 individus) et nous avons suivi leur mortalité pendant 16 jours. Nous avons quotidiennement compté les morts et les avons systématiquement retiré de la microcolonie dès leur apparition. Les traitements sont les suivants : C : contrôle, MR3 : 10^3sp/ml, MR5 : 10^5 sp/ml, MR7 : 10^7 sp/ml Le traitement influence significativement la survie des individus (Modèle de Cox : $p < 0,001$, post-hocs : MR3-C : $p=0,377$, MR5-C :$p<0,001$, MR7-C : $p<0,001$, MR5-MR3 : $p<0,001$, MR7-MR3 : $p<0,001$, MR7-MR5 : $p = 0,024$).

ANNEXE 7 : RECETTES DES DEUX DIETES PROPOSÉES AUX BOURDONS DANS LE SOUS-CHAPITRE 4.3

Tableau 12
Composition des deux régimes utilisées dans l'expérience de non-choix et de choix des bourdons exposés à *M. robertsii*.

Diète (ratio protéines : sucres)		**Diète 1 (1:199)**	**Diète 2 (1:4)**
Mélange de protéines (g/kg de diète)		**2,34**	***93,72***
Protéines (g)	Soja	0,80	31,91
	Riz	1,2	47,87
Acides aminés (mg)	*Valine*	0,03	1,17
	Méthionine	0,01	0,53
	Isoleucine	0,03	1,28
	Leucine	0,03	1,28
	Thréonine	0,05	1,81
	Phénylalanine	0,01	0,32
	Lysine	0,10	3,94
	Histidine	0,03	1,38
	Arginine	0,00	0,11
	Tryptophane	0,05	2,13
Mélange de sucres (g/kg de diète)		**402,62**	**323,21**
Sucrose		201,31	161,61
Fructose		120,79	96,96
Glucose		80,52	64,64
Gomme de Xanthane (g/kg de diète)		**1,20**	**1,20**
Gomme de Guar (g/kg de diète)		**1,20**	**1,20**
Mélange de vitamines (g/kg de diète)		**5,00**	**5,00**
Eau		**587,64**	**575,66**