

Résumé

Le frelon à pattes jaunes, *Vespa velutina*, est la première espèce de frelon introduite accidentellement en Europe. Cet insecte, originaire d'Asie, a été signalé pour la première fois en 2004 dans le Lot-et-Garonne et son expansion a été très rapide : 50% du territoire français est actuellement envahi et l'espèce a été récemment signalée en Espagne, au Portugal et en Belgique. Depuis son introduction, il est rapidement devenu un problème en raison de la prédation qu'il exerce sur les colonies d'abeille domestique *Apis mellifera*.

Cette thèse a pour objectif d'étudier, via une démarche multidisciplinaire, les différentes caractéristiques de l'espèce, tant génétiques que comportementales, pouvant expliquer le succès de son invasion en France et prédire ainsi ses potentialités d'expansion en Europe.

Grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires, la diversité génétique de la lignée envahissante de *V. velutina* a été caractérisée et comparée à celle de populations de l'aire d'origine, afin de retracer l'histoire de son introduction en France. Cette étude a montré que la population introduite provenait d'une zone géographique située entre les provinces chinoises du Zhejiang et du Jiangsu. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une importation via les échanges commerciaux entre ces régions géographiques.

Nos résultats suggèrent que l'invasion de la France dérive très probablement de l'introduction d'une seule femelle en hibernation, préalablement fécondée par plusieurs mâles. La polyandrie de *V. velutina*, système de reproduction presque unique parmi les Vespidae, ainsi que l'haplodiploïdie offrent une flexibilité génétique et peuvent avoir contribué au succès de *V. velutina* comme une espèce envahissante.

Une étude comportementale a été menée afin de déterminer si *Apis mellifera* défend ses colonies contre le nouveau prédateur *V. velutina* et, le cas échéant, comment opèrent les colonies d'abeilles. Il a été montré que l'abeille domestique en France présente un comportement de défense inefficace contre ce nouveau prédateur et que *V. velutina* exerce sur les ruchers une pression importante qui affaiblit progressivement les colonies d'abeilles. La prédation que ce frelon exerce sur l'abeille domestique a donc un coût pour l'apiculture, mais aussi sur l'environnement dans son ensemble puisque la pollinisation de nombreuses plantes cultivées et sauvages dépend des abeilles. La probable extension de sa distribution à travers l'Europe ne sera pas sans conséquences écologiques et économiques.

Mots-clés : Frelon à pattes jaunes, *Vespa velutina*, Invasion biologiques, Insectes sociaux, *Apis mellifera*, prédation, comportement de défense.

Abstract

The yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, is the first Vespidae species accidentally introduced in Europe. This insect, native to Asia, was first reported in 2004 in the Lot-et-Garonne *département* and its expansion has been rapid: 50% of French territory is being invaded and the species was recently reported in Spain, Portugal and Belgium. Since its introduction, it has rapidly become a problem because of its predation pressure on the colonies of honeybees *Apis mellifera*.

This thesis aims to study, through a multidisciplinary approach, the different species characteristics responsible for invasive success in France and thus predict its potential for expansion in Europe.

A genetic study of the invasion history was made using both mtDNA and recently generated microsatellites. To identify likely sources of introduced population and accurately describe the history of the invasions, we examined the relationships among native *V. velutina* populations from China, Indonesia and Vietnam and introduced populations from France and Korea. We demonstrated that the French population was from a geographical area between the Chinese provinces of Zhejiang and Jiangsu. These findings confirm the hypothesis of an importation via commercial exchanges between these geographic regions.

Our results suggest that the invasion of France most likely derives from the introduction of a single hibernating female, previously mated by several males. The polyandry of *V. velutina*, a reproductive system almost unique among Vespidae, and the haplodiploidy provides genetic flexibility and might have enhanced the success of *V. velutina* as an invasive species.

A behavioral study was conducted to determine whether *A. mellifera* colonies defended against the new predator *V. velutina* and how the two species interact. The results showed that the defensive strategy used in France by *A. mellifera* against this new predator is ineffective and that *V. velutina* exerts on apiaries a pressure which gradually weakens the bee colonies. Predation that hornet has on the honeybee represents a large cost not only for the beekeeping sector but also for the environment, as pollination depends strongly on honeybees. The probable extension of its distribution throughout Europe will not be without ecological and economic consequences.

Keywords: Yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina*, invasive species, Social insects, defensive behavior, *Apis mellifera*, predation.



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Diversité du Vivant

Présentée par

Mlle Mariangela ARCA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

soutenue le 2 avril 2012

devant le jury composé de :

M. SILVAIN Jean-François	Directeur de Recherche IRD	Directeur de thèse
M. ARNOLD Gérard	Chargé de Recherche CNRS	Co-encadrant
Mme GIRAUD Tatiana	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
M. FRESNEAU Dominique	Professeur Université Paris 13	Rapporteur
Mme VILLEMANT Claire	Maître de Conférences MNHN	Examineur
M. SARR Aboubakry	Professeur UPMC	Examineur
M. ROQUES Alain	Directeur de Recherche INRA	Examineur

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Diversité du Vivant

Présentée par Mlle Mariangela ARCA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)



soutenue le 2 avril 2012
devant le jury composé de :

M. SILVAIN Jean-François
M. ARNOLD Gérard
Mme GIRAUD Tatiana
M. FRESNEAU Dominique
Mme VILLEMANT Claire
M. SARR Aboubakry
M. ROQUES Alain

Directeur de Recherche IRD
Chargé de Recherche CNRS
Directeur de Recherche CNRS
Professeur Université Paris 13
Maître de Conférences MNHN
Professeur UPMC
Directeur de Recherche INRA

Directeur de thèse
Co-encadrant
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

*Ai miei genitori,
Ai miei nonni,
A Teo.*

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier Tatiana Giraud et Dominique Fresneau pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse ainsi que Claire Villemant, Alain Roques et Aboubakry Sarr qui m'ont fait l'honneur et le plaisir d'examiner ce travail.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la confiance, le soutien, la patience et la générosité de mon directeur de thèse, Jean-François Silvain, que je veux particulièrement remercier. Les conseils qu'il m'a procurés tout au long de la rédaction et de ces trois ans de doctorat, ont toujours été clairs et enrichissants, me facilitant grandement la tâche et me permettant la finalisation de cette thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Gérard Arnold, mon co-directeur de thèse, d'avoir été un co-encadrant toujours enthousiaste, d'avoir cru en mes capacités et de n'avoir cessé de m'encourager dans mes recherches et dans la valorisation des travaux. Lors de missions de terrain, son expérience et son aide précieuse ont permis de travailler dans d'excellentes conditions et toujours dans la bonne humeur.

Un merci spécial et toute mon admiration à Florence Mougel. J'ai beaucoup appris à son contact, tant scientifiquement qu'humainement. Son éclairage et ses conseils ont considérablement enrichi ma réflexion tout au long de cette thèse. Merci Flo, je t'en suis profondément reconnaissante et j'espère pouvoir prétendre à autant de compétences un jour.

I am also very thankful to Alexandros Papachristoforou for his guidance and support during the study about the defense behavior of honeybees and the predatory behavior of hornets and for being so supportive and friendly throughout the Phd period. It was a great pleasure to work with him.

Je tiens à remercier très vivement Agnès Rortais. C'est grâce à elle que j'ai pu démarrer cette magnifique aventure. Grazie mille Agnès !

Cette thèse a pu prendre forme grâce au soutien financier du Ministère de l'Agriculture et FranceAgrimer. Un grand merci à Claire Villemant, la coordinatrice du projet, qu'a toujours assuré la bonne marche du projet et la signature rapide des conventions et a fait en sorte que des modalités de financement aussi compliquées pénalisaient le moins possible mon travail. Un grand merci aussi à Myriam Harry et Sylvie Apruzzèse-Serazin pour leur aide.

Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans le concours de collègues du MNHN qui ont réalisé l'échantillonnage de frelon en Asie. De plus, les résultats de l'étude approfondie qu'ils ont menée sur la biologie du frelon, jusqu'à là quasiment inconnue, ont été pour moi une référence indispensable. Un immense merci donc à Claire Villemant, Quentin Rome, Adrien Perrard et Franck Muller.

Un grand merci à Denis Thiery, Olivier Bonnard, Nevile Maher et Karine Monceau de l'INRA de Bordeaux pour leur aide indispensable dans la mise en place des expérimentations de terrain et pour s'être occupé de « mes » abeilles. Sans leur concours le volet comportemental de ma thèse n'aurait pas pu être développé.

J'aimerais tout particulièrement remercier Thomas Guillemaud qui à travers de nombreux entretiens m'a ouvert les portes du monde complexe des statistiques et de la méthode ABC, ainsi que Stéphane Dupas pour ses brillantes intuitions, ses conseils judicieux et son appui dans l'analyse des données génétiques.

Merci à Annie pour sa disponibilité, pour tous ses efforts et sa contribution au bon déroulement des procédures administratives aboutissant à la soutenance de ma thèse et pour son dévouement pour le bien commun.

Merci à Claire Capdevielle-Dulac pour son amitié et pour m'avoir formée à toutes les techniques de biologie moléculaire.

Merci à Amandine Fossoud pour son aide technique dans le génotypage. Grazie di tutto cara !

Merci à François Rebaudo avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau mais aussi expériences et parcours communs.

Merci à tous les stagiaires Delia Dupré, Amaury Frisson, Ugoline Godeau, Mathilde Latron, et Cyril Nadeau qu'ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Merci au laboratoire L.E.G.S. qui m'a offert les conditions matérielles et humaines optimales pour mener à bien mon travail de thèse. Je remercie toutes les personnes du laboratoire qui par leur disponibilité et leur bonne humeur font de ce laboratoire un endroit très agréable.

Merci à tous les échantillonneurs de frelon, les apiculteurs, les syndicats et associations apicoles et les collègues nationaux et internationaux passionnés d'insectes à bandes noir et jaunes. Je remercie plus particulièrement Mme et M. Dufour, M. Ceyral, M. Martrenchard, M. Duret et M. Barnier, M. Naillon, M. Legrand, M. Jarnolle, Mlle Girard et M. Roby.

Enfin, je souhaite remercier tous ceux qui ont manifesté un intérêt pour mon travail et qui m'ont encouragée à rassembler les informations qui constituent aujourd'hui cette thèse.

A tous mes amis qui ont été toujours à mon côté (même si des fois milliers de km nous séparaient) et qui ont fait preuve de grande amitié : i topolini (tous les trois), Jole, Nassima et Dat, Paola et Louise, Oumaya et Jacem, Marie et Patrick, Marina, Lucia, Marco, Silvia, Cecile, Magalita. Grazie !

Un grazie di cuore a Sig. Adriano, Sig.ra Enrica, alla Manu e alle nippons, Gaia e Giulia (G&G), che con i salutini su Skype e con il loro costante interassamento hanno saputo rallegrarmi e incoraggiarmi nelle lunghe giornate di lavoro. Sono felice di festeggiare il primo fine settimana di "libertà" con voi.

Un pensiero speciale ai miei cari genitori, che con amore e fiducia, mi hanno sempre sostenuto in questo lungo percorso e per tutto ciò che da loro ho imparato e ricevuto. Il loro aiuto tacito o esplicito tante volte é venuto dal loro cuore: mi riferisco a tutte le occasioni in cui mia madre, celando in silenzio l'ansia, mi ha incoraggiata, vedendomi presa dal lavoro e preoccupata da obiettivi troppo difficili da raggiungere; ai discorsi di mio padre, quando, convinto che non stessi ascoltando, parlava di me orgoglioso. Dedicarvi questa tesi é ben poco, rispetto a quanto avete sempre fatto per me.

Oltre a tutti quelli che mi vogliono bene ringrazio le mie sorelle, Manuela e Antonella, i miei cognati Anthony e Gustavo, e la mia dolce nipotina, Maria Francesca, per essermi sempre stati vicini.

Un grazie particolare e un abbraccio affettuoso ai miei nonni, Tonia e Mario, per essere sempre stati per me modello di vita e d'amore. Se ho potuto sviluppare la mia passione per la ricerca é grazie a voi che mi avete insegnato ad essere curiosa e mi avete trasmesso un grande amore per la natura.

Infine, un grazie speciale a Teo, per tutte le tue attenzioni e premure, e per tutto cio' che sei e sarai per me...

SOMMAIRE

Introduction	1
I. Les invasions biologiques.....	1
I.1. Phases de l'invasion et processus évolutifs associés	1
I.2. Facteurs qui déterminent le succès des invasions biologiques.....	3
I.3. Les deux paradoxes des espèces invasives.....	6
I.4. Impacts des invasions biologiques	8
I.5. Contrôle des espèces invasives.....	11
I.6. La situation en Europe	12
II. Les insectes sociaux invasifs.....	13
III. Les Vespidae et les invasions biologiques.....	16
III.1. Position taxonomique du genre <i>Vespa</i> et systématique des Vespidae	16
III.2. Les Vespidae invasifs	18
IV. Présentation du modèle d'étude : le frelon asiatique, <i>Vespa velutina</i>	21
IV.1. Biologie de l'espèce.....	21
IV.2. Description des nids de <i>V. velutina</i>	22
IV.3. Régime alimentaire et écologie de la prédation.....	24
IV.4. Histoire de l'introduction de <i>V. velutina</i> en France.....	24
IV.5. Impact de l'introduction du frelon <i>V. velutina</i>	28
IV.6. Le programme « Etude de la biologie, du comportement et de l'impact de <i>Vespa velutina</i> sur les abeilles en vue d'un contrôle spécifique ».	30
V. Objectifs de la thèse	31
PARTIE I.....	33
VI. Caractérisation génétique de la lignée invasive de <i>V. velutina</i>	35
VI.1. Choix et Développement des marqueurs moléculaires en vue des études de caractérisation génétique des populations de <i>V. velutina</i>	36

ARTICLE 1 Development of microsatellite markers for the yellow-legged Asian hornet, <i>Vespa velutina</i> , a major threat for European bees.	38
VI.2. Matériel biologique utilisé	42
VI.3. Analyse génétique des populations et reconstruction de l'histoire de l'invasion	42
VI.4. Résultats de l'analyse génétique des populations de <i>V. velutina</i>	45
ARTICLE 2: A single multi-mated female is at the origin of Europe invasion by the Yellow-legged hornet <i>Vespa velutina</i>	48
VI.5. Structure génétique des nids	108
PARTIE II	114
VII. Impact du frelon asiatique sur une espèce proie : l'abeille domestique <i>Apis mellifera</i>	116
VII.1. Etude du comportement de défense de l'abeille domestique <i>A. mellifera</i>	116
ARTICLE 3: Ineffective defense strategy of <i>Apis mellifera</i> in France against the new invasive hornet <i>Vespa velutina</i>	123
VII.2. Impact de la prédation de <i>V. velutina</i> sur l'activité des abeilles.	152
VII.2.1. Matériels et méthodes.....	152
VII.2.2. Résultats	155
VII.2.3. Discussion.....	159
Discussion générale et conclusion.....	164
Perspectives	173
Références bibliographiques	178

INTRODUCTION

I. LES INVASIONS BIOLOGIQUES.

Les invasions concernant des espèces non indigènes (exotiques), c'est à dire celles qui sont implantées, involontairement ou non, dans une région située hors de leur aire d'origine, sont considérées comme la troisième cause de perte de biodiversité dans le monde, après la perte d'habitat et la fragmentation du paysage (Walker & Steffen 1997). L'impact économique de ces espèces est une préoccupation majeure dans le monde entier (Pimentel *et al.* 2005). La constante augmentation des problèmes écologiques et économiques liés aux invasions biologiques nécessite une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels une espèce introduite dans un nouvel environnement arrive à s'établir et à se propager et la gestion et le contrôle des espèces non indigènes est sans doute le plus grand défi que les biologistes de la conservation devront relever dans les prochaines décennies.

L'étude des invasions biologiques s'est développée exponentiellement depuis une quinzaine d'année. Le présent travail s'inscrit dans cet effort de compréhension des causes et des conséquences des invasions biologiques.

I.1. PHASES DE L'INVASION ET PROCESSUS EVOLUTIFS ASSOCIES

Le processus d'invasion peut être décrit selon une séquence d'introduction-établissement-prolifération (**Figure 1**). Le passage d'une étape à l'autre nécessite le franchissement d'un ou de plusieurs barrière(s) naturelle(s), et peut s'accompagner de changements évolutifs.

La première étape est l'**introduction**, qui implique l'apport d'individus, ou propagules, dans un nouveau site, situé hors de l'aire de répartition naturelle. L'homme joue un rôle fondamental, volontaire ou accidentel, dans cette dispersion à longue distance car il aide les espèces à passer les barrières géographiques. Ces propagules doivent ensuite être capables de survivre dans les conditions environnementales locales. La phase d'introduction peut induire un effet de fondation, ou *effet fondateur*, c'est-à-dire une réduction de la diversité génétique au sein de la zone d'introduction (Allendorf & Lundquist 2003). En effet, le pool génétique introduit peut ne pas être représentatif de toute la variabilité génétique présente dans l'aire d'origine.

La deuxième étape est l'**établissement**, qui nécessite que les individus de la (des) population(s) introduite(s) donnent lieu à de nouvelles générations pour atteindre le stade de population viable sans nouvel apport de propagules. Pour cela, l'espèce doit être capable de se reproduire et de produire des descendants sur le long terme. A ce stade, les événements évolutifs possibles sont la sélection de génotypes pré-adaptés au sein du pool génétique introduit, la formation de nouvelles lignées génétiques par croisement entre génotypes jusque là isolés dans l'aire d'origine.

La dernière étape qui conduit à l'invasion est la **prolifération**. Elle nécessite que la population initiale produise de nouvelles populations viables capables de se disperser. Une fois l'expansion en cours, d'autres obstacles peuvent apparaître liés aux conditions environnementales dans les habitats progressivement envahis. Les événements évolutifs liés à l'expansion dans la zone envahie peuvent être l'effet de fondation, la sélection des génotypes pré-adaptés, les recombinaisons génétiques par croisement suivis de la sélection graduelle des génotypes adaptés (adaptation), l'hybridation avec des espèces locales (Ellstrand & Schierenbeck 2000; Tiébré *et al.* 2007) et/ou l'introggression (Suehs *et al.* 2004). Ces différents processus ne sont pas exclusifs et peuvent se combiner au cours de l'invasion.

La phase de prolifération est fréquemment précédée par une phase de latence (*lag phase*) plus ou moins longue (Kowarik 1995 ; Williamson 1996) pendant laquelle la densité de la population peut être très faible, voire indétectable. Cette latence peut s'expliquer de différentes façons : le temps relatif à la croissance des populations, le temps nécessaire aux organismes pour surmonter les contraintes écologiques ; le temps nécessaire à l'acquisition de nouvelles capacités liées aux facteurs génétiques qui peuvent améliorer la valeur adaptative des individus, etc. (Kowarik, 1995). Les espèces capables d'adaptation locale rapide (Reznick & Ghalambor 2001 ; Lee *et al.* 2007) ou présentant une importante plasticité phénotypique (West-Eberhard 1989 ; Fordyce 2006) sont plus particulièrement aptes à proliférer dans leur nouvel environnement et donc à devenir envahissantes.

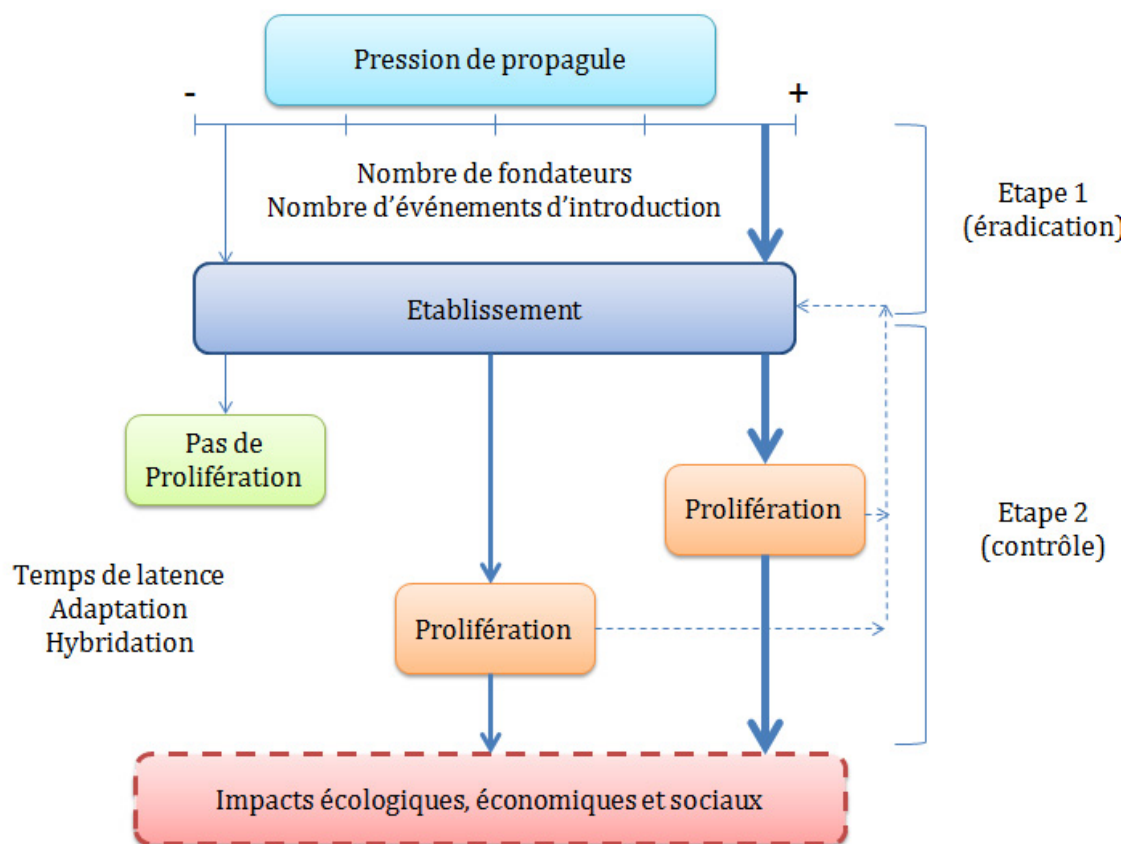


Figure 1. Les étapes d'une invasion biologique qui coïncident généralement avec deux réponses de gestion différentes. Plus la pression de propagule est importante, plus l'espèce envahissante a de chances de s'établir et de proliférer dans l'aire d'introduction. Au contraire, si la pression de propagule est faible, l'établissement et la propagation de l'espèce peuvent être limités par de conditions environnementales particulières. D'après Allendorf & Lundquist (2003).

I.2. FACTEURS QUI DETERMINENT LE SUCCES DES INVASIONS BIOLOGIQUES

Les espèces introduites ne deviennent pas toutes envahissantes. On considère généralement que seulement une sur 10 espèces introduites parvient à s'établir, et que seulement une espèce sur 10 nouvellement établies devient envahissante en développant des populations denses. Les facteurs susceptibles de favoriser ou de défavoriser une invasion biologique sont de trois natures : écologiques, démographiques et génétiques.

Facteurs écologiques

Premièrement, les facteurs écologiques correspondent aux caractéristiques de l'environnement qui sont susceptibles de favoriser ou non l'installation d'une espèce

exotique envahissante. C'est ainsi que l'absence ou le nombre réduit de prédateurs et de compétiteurs spécifiques ("Enemy Release Hypothesis") est l'une des causes généralement admise pour expliquer, au moins en partie, l'explosion démographique d'une espèce en dehors de son aire d'origine (Blumenthal 2006 ; Colautti *et al.* 2004 ; Facon *et al.* 2006 ; Keane & Crawley 2002 ; Liu & Stiling 2006). La similitude des climats entre la zone d'origine et la zone d'introduction est également susceptible de favoriser l'installation puis l'explosion démographique d'une espèce exotique (Palmer *et al.* 2010 ; Pauchard & Alaback 2004). La libération d'une niche écologique dans le nouvel environnement, induite par exemple par une pression anthropique, peut être aussi particulièrement importante (Williamson 2006). Par exemple, le fait d'éliminer beaucoup d'organismes non-cibles avec des pesticides libère des niches écologiques dans lesquelles prolifèrent des espèces plus résistantes (Wan *et al.* 2009). L'aménagement du paysage peut également modifier la diversité spécifique locale et ainsi faciliter l'intégration d'une nouvelle espèce (Gelbard & Belnap 2003 ; Pauchard & Alaback, 2004). Par exemple, la création de bandes végétales homogènes a favorisé l'installation de phytopathogènes. C'est notamment le cas de l'alignement de clones d'ormes (*Ulmus* spp.) qui s'est avéré favorable à la diffusion de la Graphiose de l'orme (*Ophiostoma ulmi*) ; ou encore de l'alignement de clones de peupliers qui s'est révélé favorable à la diffusion de la rouille du peuplier (*Melampsora medusae*). Il a été démontré qu'un grand nombre de pratiques agricoles ont aussi un fort impact sur les écosystèmes et pourraient favoriser les invasions biologiques. On peut citer notamment la rotation des cultures, la diminution de la diversité des espèces cultivées, l'augmentation des apports en engrais, l'augmentation de la culture des céréales d'hiver aux dépens de celles du printemps, les labours profonds mécanisés, l'augmentation de la taille des parcelles et la fragmentation des habitats (Burel *et al.* 1998 ; Petit & Burel, 1998). Enfin des modifications plus globales, telles que l'augmentation des échanges entre zones géographiques éloignées (ouverture de nouvelles routes commerciales, disparition de barrières géographiques) peuvent influencer le régime de migration de certaines espèces et ainsi favoriser leur dissémination (Facon *et al.* 2006 ; Gelbard & Belnap, 2003). Cette fragilisation des écosystèmes peut donc favoriser l'installation d'espèces exotiques potentiellement envahissante.

Facteurs démographiques

Des facteurs démographiques peuvent également influencer les invasions biologiques. Parmi ces facteurs, une attention particulière a été portée à la **pression de propagule** qui s'intéresse à la fois au nombre d'évènements d'introductions d'une espèce dans un nouvel environnement (nombre de propagule) et au nombre d'individus introduits (taille de la propagule) lors de chaque introduction (Hopper *et al.* 1993). De nombreux auteurs ont ainsi pu montrer que plus le nombre d'introductions et/ou la taille initiale de la (ou des) population(s) sont importants, plus la population a des chances de s'établir (Grevstad 1999 ; Lockwood *et al.* 2005 ; Memmott *et al.* 2005 ; Williamson 2006) (**Figure 1**). Ceci s'explique par le fait qu'une forte pression de propagule peut permettre à une population exotique de faire face à la pression de l'environnement sur sa survie et sa reproduction et augmente ses chances de pouvoir s'adapter avec succès aux nouvelles pressions de sélection auxquelles elle fait face. D'autres facteurs démographiques sont également susceptibles de favoriser ou défavoriser une invasion biologique, en particulier la structure de la population (sex-ratio, âge), le mode de reproduction, la capacité de dispersion ou le taux d'accroissement de la population (Facon *et al.* 2006 ; Hopper *et al.* 1993).

Facteurs génétiques

Le niveau de diversité génétique a reçu de plus en plus d'attention parmi les facteurs qui influencent le potentiel d'adaptation et de survie d'une espèce introduite (Lee 2002 ; Facon *et al.* 2006).

Les analyses comparatives de la variabilité génétique entre populations invasives et populations de la zone d'origine révèlent des tendances très diversifiées (Cox 2004 ; Puillandre *et al.* 2008). Les populations récemment introduites montrent souvent une diversité génétique réduite par rapport aux populations d'origine (Puillandre *et al.* 2008). Une étude récente conduite sur 80 espèces invasives a montré que plus de la moitié de ces espèces manifestait une perte de diversité allélique supérieure à 20% (Dlugosh & Parker 2008). C'est par exemple le cas de nombreux insectes invasifs (Tsutsui *et al.* 2000 ; Schmid-Hempel *et al.* 2007 ; Puillandre *et al.* 2008). Cette réduction de diversité génétique est le résultat d'un «effet fondateur» pour lequel les individus introduits portent seulement une petite portion de la diversité génétique des

populations sources (LockWood *et al.* 2005). Ce goulot d'étranglement génétique (pression de propagule faible) est susceptible de diminuer les capacités d'adaptation des populations exotiques dans un nouvel environnement. Ce problème est d'ailleurs évoqué dans le domaine de la biologie de la conservation où les populations d'espèces en voie de disparition sont de petite taille suite aux effets d'un goulot d'étranglement ou d'une fragmentation du milieu (Allendorf & Lundquist 2003).

I.3. LES DEUX PARADOXES DES ESPECES INVASIVES

Le succès des invasions biologiques dans de nouveaux environnements malgré la présence de nombreux obstacles à leur établissement soulève deux paradoxes. En effet le processus adaptatif repose sur la sélection de génotypes particuliers parmi une grande diversité d'individus. Les allèles portés aux différents gènes sont ainsi réassortis pour approcher la ou les meilleure(s) combinaison(s) multigénique(s) face aux pressions environnementales. Ce processus est lent et aboutit à une coévolution entre une espèce et l'écosystème dans lequel elle vit. Or les espèces invasives montrent des capacités d'adaptation qui vont à l'encontre de ce schéma bien établi :

1. *Elles sont capables de s'adapter à un nouvel environnement malgré une diversité génétique initiale généralement faible* (Frankham *et al.* 2005).
2. *Elles montrent une adaptation extrêmement rapide à un environnement auquel elles n'ont jamais été confrontées précédemment et sont même capables de supplanter les espèces en place* (Sax & Brown 2000).

Il convient donc de répondre aux questions que soulèvent ces deux paradoxes. Des études récentes ont essayé d'expliquer le premier paradoxe en mesurant la diversité génétique et en testant la présence de goulots d'étranglement génétique dans les populations introduites (par exemple : Fonseca *et al.* 2000, Tsutsui *et al.* 2000, Zeisset & Beebee 2003 ; Rasner *et al.* 2004 ; Puillandre *et al.* 2008). Les résultats montrent que, même si beaucoup d'espèces invasives montrent une réduction de diversité génétique et des signes de goulots d'étranglement génétique (Puillandre *et al.* 2008), cette baisse de diversité n'est pas défavorable pour l'établissement et la prolifération de l'espèce, probablement à cause de l'expansion rapide des populations après l'introduction (Cabe 1998 ; Zeisset & Beebee 2003). En effet, si le taux de croissance démographique est

élevé, des niveaux relativement élevés d'hétérozygotie peuvent être maintenus, même si la population a subi un goulot d'étranglement. Ceci est vrai surtout si le goulot d'étranglement n'a pas été trop marqué et si plusieurs individus ont été introduits (Nei *et al.* 1975). Une augmentation du succès invasif est aussi possible suite à un goulot d'étranglement. Un exemple remarquable est le cas de la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis*, longtemps utilisée en lutte biologique contre les pucerons et devenue envahissante en Amérique du Sud, en Europe et en Afrique. Facon et collègues (2011) ont démontré que les goulots d'étranglement ont purgé les populations des allèles délétères responsables de la dépression de consanguinité et donc augmenté la valeur sélective des individus invasifs.

Le premier paradoxe peut être aussi résolu par des effets positifs indirects de la diversité génétique réduite sur le comportement adaptatif. C'est par exemple le cas de l'invasion de l'Amérique du Nord par la fourmi Argentine *Linepithema humile*. Les populations de *L. humile* ont en effet subi un fort goulot d'étranglement génétique responsable d'une variabilité génétique très réduite (60% de diminution de l'hétérozygotie attendue par rapport à l'aire d'origine (Tsutsui *et al.* 2000)) et d'un probable manque de variation aux loci responsables de la reconnaissance intra-colonie, conduisant à la formation d'une « supercolonie » très étendue (Suarez *et al.* 1999; Tsutsui *et al.* 2000 ; Tsutsui *et al.* 2003). Dans cet exemple, la perte de diversité génétique, probablement liée à l'introduction d'un nombre limité d'individus, a permis la réussite de l'établissement.

Pour certaines populations introduites cependant, aucune perte de diversité génétique ne se produit. Dans certains cas, en effet, la diversité génétique peut même augmenter par rapport à celle des populations d'origine. C'est par exemple le cas d'une espèce de lézard du genre *Anolis* originaire des Caraïbes, qui a été largement introduite dans le monde entier (Hawaii, Taiwan et Etats-Unis). L'une des clés du succès invasif de cette espèce pourraient être des multiples évènements d'introduction et l'apparition de nouvelles combinaisons alléliques dues à l'hybridation entre populations issues de différentes sources. Ces hybridations transformeraient la somme des variabilités génétiques inter-populations des zones d'origine en une variabilité intra-population dans les zones d'introduction (Kolbe *et al.* 2004).

Plusieurs phénomènes peuvent expliquer le deuxième paradoxe. Tout d'abord, l'environnement d'introduction est nouveau, mais pas forcément différent de l'environnement d'origine de l'espèce envahissante, qui peut profiter d'une niche vide ou disponible pour proliférer (Shea & Chesson 2002 ; Facon *et al.* 2006). On peut parler dans ce cas de « préadaptation » de l'espèce envahissante. Ensuite, le changement d'environnement pourrait se révéler bénéfique pour l'espèce introduite. En effet, l'absence d'ennemis naturels (compétiteurs, prédateurs ou parasites) dans la région d'introduction faciliterait l'installation des espèces exotiques, en leur permettant d'allouer davantage de ressources à la reproduction ou à la croissance et moins à la compétition ou à la défense contre les antagonistes (Tourchin *et al.* 2002 ; Colautti *et al.* 2004 ; Genton *et al.* 2005). Les espèces exotiques pourraient alors avoir un avantage compétitif par rapport aux espèces locales qui doivent, en plus de la nécessité de répondre à la pression exercée par rapport aux espèces introduites, faire face à leurs prédateurs, parasites et compétiteurs naturels présents dans leur habitat naturel. Enfin, l'environnement de la zone envahie peut aussi évoluer vers de conditions favorables à l'espèce envahissante, un cas souvent observé avec les perturbations écologiques liées aux activités humaines (Foley *et al.* 2005).

I.4. IMPACTS DES INVASIONS BIOLOGIQUES

Les impacts des invasions biologiques, écologiques comme économiques, peuvent être difficiles à déterminer et dépendent fortement de la perception humaine (Lockwood *et al.* 2008). Les **conséquences économiques** des espèces invasives peuvent être considérables. Aux Etats-Unis par exemple, l'établissement d'environ 50.000 espèces non indigènes a causé des pertes économiques estimées à plus de 125 milliards de dollars par an (Pimentel *et al.* 2005). Le coût et la perte de profit qu'elles entraînent ont fortement participé à la prise de conscience du phénomène (Perrings *et al.* 2002). Les secteurs agricoles sont les plus touchés (Huber *et al.* 2002). Par exemple, l'oomycète *Phytophthora infestans*, l'agent causal du mildiou de la pomme de terre, a été introduit en Europe vers le 1843 (Andrivon 1996) et a été la cause de la « Grande Famine » en Irlande entre 1845 et 1849. Un autre exemple célèbre, le phylloxéra parasite de la vigne (*Dactylosphaera vitifoliae*), a eu une importance économique et sociale dramatique sur la

viticulture française et européenne dans la deuxième moitié du 19^{ème} siècle (Carton *et al.* 2007). Pareillement, *Ceratitis capitata*, la mouche méditerranéenne des fruits, est un ravageur bien connu des cultures fruitières originaire d'Afrique. Il a envahi les Amériques et l'Australie au cours du 19^{ème} et du 20^{ème} siècle et il est aujourd'hui un des ravageurs les plus redoutables, car il attaque plus de 200 espèces cultivées différentes (Davies *et al.* 1999).

Les invasions biologiques ont aussi un **impact écologique** important. Cet impact est plus difficile à estimer. De plus, il est susceptible d'être modulé dans le temps (Strayer *et al.* 2006). Les espèces invasives perturbent les communautés envahies par des interactions directes avec les espèces autochtones par prédation, compétition, hybridation ou encore par parasitisme, mais altèrent également indirectement le fonctionnement des communautés d'accueil et des écosystèmes par des cascades de réactions dans les réseaux trophiques.

L'introduction d'un prédateur dans un nouvel écosystème peut avoir des conséquences désastreuses sur les espèces locales devenues proies. Une forte pression de prédation peut amener à une réduction importante de l'effectif des populations locales d'une espèce, à un déplacement de ses populations, ou encore, si cette pression est trop forte, à la disparition de l'espèce. Un exemple bien connu est l'introduction du serpent brun arboricole, *Boiga irregularis*, originaire d'Australie, de Nouvelle-Guinée et des îles Salomon vers l'île de Guam (Williamson & Fitter 1996). Ce prédateur a perturbé les communautés locales (Savidge 1987) en diminuant les effectifs des populations de 12 espèces d'oiseaux et de 11 espèces de lézards, et a causé la disparition de 25 espèces d'oiseaux (Wiles *et al.* 2003). Ces pertes semblent être expliquées par l'absence de comportement de fuite des proies non adaptées à ce prédateur (Fritts & Rodda 1998). Un autre exemple est celui de la perche du Nil, *Lates niloticus*, introduite dans le lac Victoria (Afrique de l'Est). Ce poisson a entraîné la disparition de plus de 50% des 600 espèces endémiques du lac (Kaufman 1992, Schofield & Chapman 1999).

L'introduction d'un nouveau compétiteur a également un impact important sur les espèces locales. Les conséquences sont identiques à celles de l'introduction d'un prédateur : réduction des effectifs des populations locales, déplacement de ces populations ou, sur le long terme, disparition des populations autochtones. En

Angleterre l'introduction de l'écureuil gris *Sciurus carolinensis*, originaire d'Amérique du Nord, a engendré une forte diminution de l'aire de répartition de l'écureuil roux *Sciurus vulgaris* autochtone, principalement par compétition (Gurnell *et al.* 2004).

Les hybridations entre espèces introduites et autochtones peuvent être également à l'origine de nouveaux compétiteurs hybrides. Ce phénomène est nommé « effet d'hétérosis » ou « vigueur hybride » et se traduit par la supériorité de l'individu hybride pour de nombreux caractères, comme par exemple le potentiel reproductif et résistance aux maladies. Le cas est bien connu chez une herbacée, *Spartina anglica*, taxon dérivé d'une espèce américaine introduite *S. alterniflora* et d'une espèce européenne *S. maritima* (Ellstrand & Schierenbeck 2000). Cet hybride a envahi de nombreuses côtes françaises et anglaises, remplaçant l'espèce autochtone.

L'introduction d'espèces exotiques est souvent accompagnée de tout ou partie des parasites qui lui sont inféodés. Ces nouveaux parasites induisent des dégâts importants par le fait que les espèces autochtones n'ont pas co-évolué avec eux et n'ont pas développé de résistance vis-à-vis de ces pathogènes. C'est par exemple le cas de la cochenille du manioc (*Phenacoccus manihoti*), originaire d'Amérique du Sud, et introduite accidentellement en Afrique au début des années 70. Depuis cette date, elle cause beaucoup de dégâts aux cultures de manioc, plante elle-même introduite du continent américain et denrée d'importance capitale dans l'alimentation en Afrique subsaharienne (Matile-Ferrero 1977).

D'une manière générale, les espèces envahissantes provoquent des perturbations souvent irréversibles dans le fonctionnement des écosystèmes en modifiant les interactions trophiques entre organismes (Williamson & Fitter 1996). C'est le cas de certains herbivores, comme le lapin, *Oryctolagus cuniculus* (Fenner & Fantini 1999) et le mouton *Ovis aries* (Kaeuffer *et al.* 2009). Introduits sur des îles, ils détruisent ou transforment profondément les communautés végétales provoquant une amplification de l'érosion (Chapuis *et al.* 1994).

Des espèces envahissantes peuvent également avoir de **conséquences sanitaires** et poser d'importants problèmes pour la santé humaine et animale. Par exemple, l'*Ambrosia artemisiifolia*, plante herbacée annuelle de la famille des Astéracées,

introduite d'Amérique du nord en Europe à la fin du 19^e siècle, provoque de graves allergies.

Les invasions ne produisent pas uniquement des effets négatifs. Il ne faut pas oublier que la domestication d'espèces introduites contribue depuis des milliers d'années à nourrir l'homme. De plus, récemment il a été prouvé que l'invasion d'espèces exogènes pouvait créer des conditions permettant de promouvoir la diversification (Vellend *et al.* 2007). Cette diversification est définie comme une augmentation de la diversité génétique dans des populations d'espèces indigènes ou exotiques. Une grande diversité génétique dans les populations introduites provient souvent d'introductions répétées d'individus en provenance de divers lieux d'origine. C'est par exemple le cas du lézard cubain, *Anolis sagrei*, pour lequel huit introductions en Floride ont généré plus de variations génétiques que celles présentes dans les populations d'origine (Kolbe *et al.* 2004). En outre, grâce aux phénomènes d'hybridation, les invasions biologiques peuvent conduire à l'apparition de nouvelles espèces et donc à une diversification (Vellend *et al.* 2007). Cependant, aujourd'hui les études sur les invasions montrent bien plus d'exemples d'effets négatifs que positifs.

I.5. CONTROLE DES ESPECES INVASIVES

Devant la menace que représentent les espèces envahissantes pour la biodiversité, la solution la plus adaptée serait de prévenir toute future introduction dans de nouvelles aires géographiques (IUCN 2000 ; Genovesi & Shine 2003). Une attention particulière devrait être portée aux espèces déjà considérées comme invasives dans certaines régions (Williamson 1999 ; Lockwood *et al.* 2001 ; Simberloff 2003 ; Marchetti *et al.* 2004), même si l'impact d'une espèce peut différer d'une aire d'introduction à l'autre (Byers *et al.* 2002).

Pour les populations envahissantes en place, trois stratégies permettent de diminuer l'impact d'une espèce : l'exclusion, l'éradication ou le contrôle (Courchamp *et al.* 2003). La première implique le retrait de l'espèce d'une zone géographique limitée, elle n'est envisagée que comme une solution locale. La deuxième, l'**éradication**, c'est à dire le retrait de tous les individus potentiellement reproducteurs ou leur maintien durable à de faibles densités, peut être envisageable dans certaines circonstances (Myers *et al.*

2000). L'éradication est d'ailleurs la méthode conseillée par l'IUCN (2000) et la Convention sur la Diversité Biologique (Article 8). En général, les opérations d'éradication ont plus de chances de réussir si l'espèce a été introduite depuis peu de temps, et si elle se trouve dans la phase de latence précédant la prolifération (Byers *et al.* 2002) (**Figure 1**). Par contre, de nombreuses tentatives d'éradication se sont avérées vaines, malgré les importants efforts humains et financiers déployés. Les campagnes d'éradication de la mouche *Ceratitis capitata* en Californie, ont, par exemple, coûté 500 millions de dollars en 25 ans (Myers *et al.* 2000) mais n'ont pas permis une éradication durable de l'espèce. De même, dans le Massachussetts, la destruction massive des cocons du lépidoptère sphingidé, *Bombyx disparate*, n'a pas permis d'éradiquer l'espèce invasive qui est réapparue 10 ans après (Davies *et al.* 1999).

Quand l'éradication s'avère impossible, des stratégies de réduction des effectifs peuvent être mises en place pour limiter les effets négatifs des espèces introduites. Il existe différentes **méthodes de contrôle** en fonction de l'espèce considérée : physiques (piégeage, tir), chimiques (poisons) ou biologiques (Courchamp *et al.* 2003). La lutte biologique, c'est à dire l'introduction d'une espèce pour en éliminer une autre, est parfois conseillé (Ehler 1998). Cependant, cette méthode est controversée car les risques associés peuvent être importants, l'espèce introduite en vue du contrôle peut nuire aux espèces autochtones ou également devenir envahissante (Simberloff & Stiling 1996 ; Courchamp *et al.* 2003). Dans certains cas, il peut être nécessaire de retarder les opérations de contrôle pour avoir le temps d'obtenir une connaissance approfondie de l'espèce. En effet, l'obtention de données biologiques précises peut s'avérer très utile pour des programmes de contrôle surtout quand les possibilités d'éradication sont exclues (Simberloff 2003).

Chacune des méthodes exposées présentent des avantages et des inconvénients, et souvent, une combinaison de ces stratégies semble la réponse la plus efficace aux introductions (Courchamp *et al.* 2003).

I.6. LA SITUATION EN EUROPE

Ces dernières années ont été caractérisées par un fort accroissement des travaux concernant les espèces exotiques envahissantes. C'est ainsi que l'Union Internationale

pour la Conservation de la Nature (UICN) a mis en place une base de données globale concernant ces espèces à l'échelle mondiale. Parallèlement, un travail d'inventaire, DAISIE ("Delivering Alien Invasive Species Inventories in Europe"), a été mis en place pour répertorier les espèces exotiques envahissantes présentes en Europe et approfondir nos connaissances les concernant (biologie, distribution, impacts, etc.). Cet inventaire compte un total de 10 961 espèces parmi lesquelles on trouve 2426 invertébrés terrestres. Une première analyse de ces données confirme l'accroissement des introductions d'espèces exotiques ces dernières années puisqu'entre 2000 et 2007, en moyenne 19 espèces exotiques d'invertébrés, en grande majorité des insectes, se sont établies chaque année en Europe, contre dix entre 1950 et 1975.

Parmi les espèces introduites en Europe 300 sont des Hyménoptères. L'Amérique du Nord représente la source principale (96 espèces, 35,3%), suivie par l'Asie (84 espèces, 30,9%) et l'Afrique (49 espèces, 18%) (Rasplus *et al.* 2010). Le nombre de nouveaux enregistrements d'Hyménoptères exotiques a augmenté de façon exponentielle au cours des 200 dernières années. Le nombre d'Hyménoptères établis en Europe a atteint un maximum de 5 espèces par an entre 1975 et 2006 (Rasplus *et al.* 2010).

II. LES INSECTES SOCIAUX INVASIFS

Les insectes sociaux figurent parmi les animaux les plus invasifs, causant souvent des dégâts considérables. D'après l'ISSG, Invasive Species Specialist Group (IUCN) et Lowe *et al.* (2001), dans la liste des 100 espèces invasives les plus néfastes au monde, se trouvent 14 espèces d'insectes dont 7 espèces d'insectes sociaux. Ces insectes sociaux comptent essentiellement 2 groupes taxonomiques, les Hyménoptères et les Isoptères. Ils sont caractérisés par le niveau le plus élevé de la socialité (l'eusocialité) défini par 3 caractéristiques (Michener 1969 ; Wilson 1971) : chevauchement des générations, coopération dans le soin aux jeunes et spécialisation d'individus dans la reproduction avec apparition de castes reproductrices et stériles.

Parmi ces 7 espèces d'insectes sociaux invasifs 5 sont des fourmis : *Anoplolepis gracilipes* (la fourmi folle jaune), *Linepithema humile* (la fourmi d'Argentine), *Pheidole*

megacephala (la fourmi à grosse tête), *Solenopsis invicta* (la fourmi de feu) et *Wasmannia auropunctata* (la petite fourmi de feu). Les deux dernières espèces sont respectivement une guêpe et un termite : *Vespula vulgaris* (la guêpe commune) et *Coptotermes formosanus* (le termite de Formose).

Comme décrit précédemment, le succès invasif dépend de l'interaction entre l'espèce introduite et l'environnement d'accueil. Chez les insectes sociaux, leur succès invasif est attribué à leur caractère commun : la socialité (Moller 1996 ; Chapman & Bourke 2001). D'abord, ces insectes peuvent bénéficier à la fois d'une réponse individuelle, mais aussi de l'action positive du groupe, ainsi la perte d'un individu est moins néfaste que dans le cas d'individus solitaires (Moller 1996). Ensuite, ils développent des colonies très populeuses qui leur confèrent la capacité d'exploiter efficacement les sources de nourriture et de concurrencer les espèces locales (Moller 1996). Le fait de vivre en société offre une défense plus efficace contre les prédateurs par rapport aux espèces solitaires (Moller 1996). Chaque colonie peut produire de nombreux individus reproducteurs qui fournissent des grandes capacités de dispersion (Moller 1996; Davidson 1998). Cette organisation en société procure également une flexibilité au niveau de leur mode de reproduction et de dispersion (Moller 1996, Chapman & Bourke 2001).

La **polygynie**, par exemple, qui désigne les colonies constituées de plusieurs reines, à l'inverse d'une colonie monogyne qui n'en possède qu'une seule (Hölldobler & Wilson 1990 ; Passera 1994), peut être vue comme un mécanisme favorisant la dispersion dans l'environnement. Elle est en effet souvent associée à la reproduction par « bouturage » ou « budding », où un groupe d'ouvrières et de reproducteurs s'isolent de la colonie mère pour s'installer un peu plus loin. Cette stratégie de dispersion peut permettre l'établissement d'une nouvelle colonie, lorsque la dispersion par les reproducteurs ailés ne peut pas se réaliser. Elle peut permettre une dispersion plus rapide, par le fait que la présence de plusieurs reproducteurs accélère la croissance de la colonie (Vargo & Fletcher 1989) et augmente la chance que le groupe d'individus introduits dans la nouvelle aire contienne des femelles reproductrices capables d'initier de nouvelles colonies (Hee *et al.* 2000). De nombreuses espèces d'Hyménoptères introduites en dehors de leur aire de répartition naturelle montrent des colonies polygynes. C'est par

exemple le cas de la fourmi de feu, *Solenopsis invicta*, dont les colonies polygynes nord-américaines peuvent contenir plus de 200 reines (Ross & Keller 1995).

Le **changement dans le système de la reproduction et de la structure sociale** est aussi l'une des clés de la prolifération de certaines espèces envahissantes et s'avère être un facteur promoteur des invasions (Holway *et al.* 2002 ; Abbott 2005). Des changements dans la structure sociale ont été très bien décrits chez les 5 espèces de fourmis les plus invasives : *A. gracilipes*, *L. humile*, *P. megacephala*, *S. invicta* et *W. auropunctata*. Elles montrent majoritairement une organisation sociale unicoloniale dans l'aire d'introduction, contrairement aux populations d'origine qui présentent des colonies multiples et une agressivité entre colonies (Morel *et al.* 1990 ; Giraud *et al.* 2002 ; Drescher *et al.* 2007 ; Suarez & Tsutsui 2008 ; Fournier *et al.* 2009 ; Orivel *et al.* 2009 ; Helanterä *et al.* 2009 ; Thomas *et al.* 2010). L'**unicolonialité**, définie comme une absence d'agressivité intraspécifique et de frontière coloniale entre nids, permet l'échange de nourriture, d'ouvrières, et de reines fertiles (Bourke & Franks 1995 ; Suarez *et al.* 2008 ; Helanterä *et al.* 2009). Cette caractéristique leur permet d'augmenter considérablement leur population. En effet, l'organisation unicoloniale semble apporter un avantage écologique déterminant à toutes les fourmis envahissantes possédant ce trait (Holway & Suarez 2004 ; Le Breton *et al.* 2005).

Des changements de la structure sociale ont été décrits chez d'autres insectes sociaux invasifs. Le bourdon *Bombus terrestris*, par exemple, dans l'aire d'introduction, montre des colonies plus grandes par rapport à celles des zones d'origine avec une augmentation d'un à deux du nombre de générations par an (Buttermore 1997 ; Nagamitsu & Yamagishi 2009). L'abeille africaine, *Apis mellifera scutellata*, présente des colonies beaucoup plus peuplées dans la zone d'introduction par rapport aux colonies des populations d'origine (Schneider *et al.* 2004).

Ainsi, la socialité apparaît être une caractéristique avantageuse pour passer plus facilement les barrières écologique et reproductive de l'invasion citées précédemment (Chapman & Bourke 2001).

III. LES VESPIDAE ET LES INVASIONS BIOLOGIQUES

III.1. POSITION TAXONOMIQUE DU GENRE *VESPA* ET SYSTEMATIQUE DES VESPIDAE

La famille des *Vespidae* appartient à la superfamille des *Vespoidea* qui fait partie de l'ordre des Hyménoptères, du sous-ordre des Apocrites et constitue avec les *Apoidea* et les *Chrysidoidea* le groupe des Aculéates, Hyménoptères possédant un aiguillon terminal.

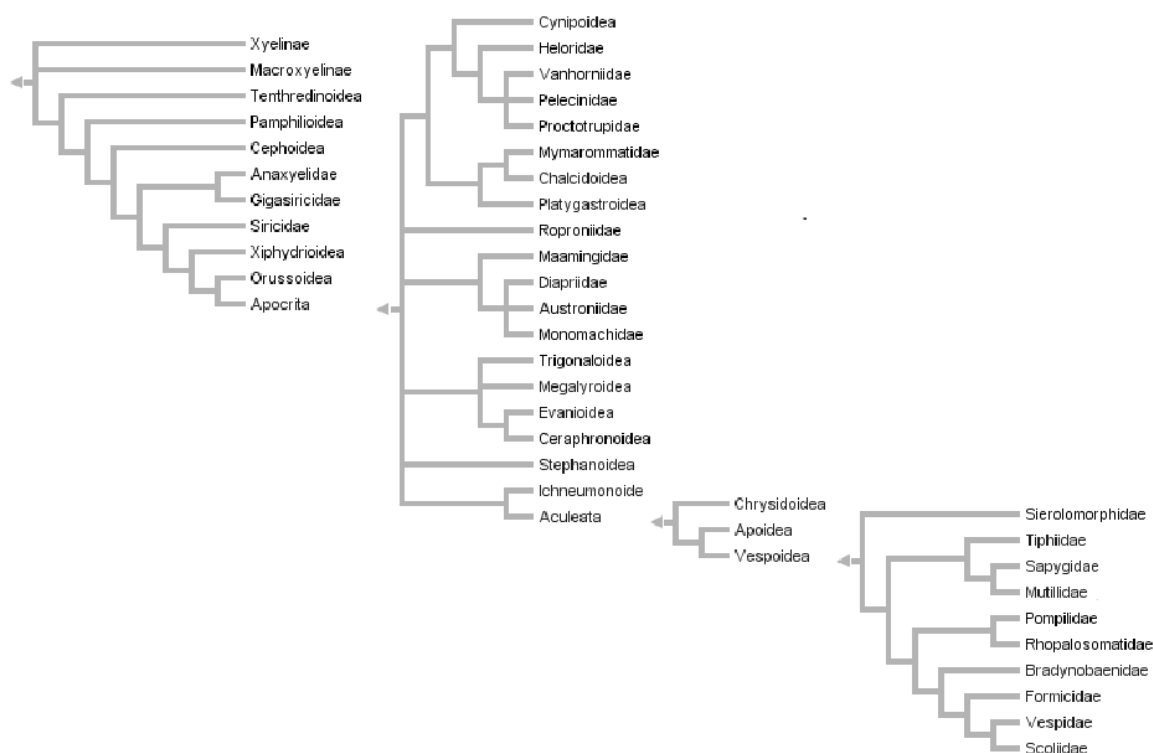


Figure 2. Position des Vespidae dans l'arbre phylogénétique des Hyménoptères. D'après Vilhelmsen 2001, Grimaldi *et al.* 1997, Whitfield 1998, Dowton & Austin 2001, Sharkey & Roy 2002, Schulmeister 2003, Pickett & Carpenter. 2010

La famille des *Vespidae* est une famille très répandue et diversifiée comprenant plus de 5000 espèces, dont la majorité sont des guêpes et frelons eusociaux, même s'il existe de nombreuses espèces solitaires (Pickett & Carpenter 2010). La famille des *Vespidae* est actuellement classée en six sous-familles : les Euparagiinae (dix espèces) et les Masarinae (344 espèces) sont solitaires ; les Eumeninae (3579 espèces) présentent à la fois un comportement solitaire et présocial ; les Stenogastrinae (58 espèces) sont

eusociaux facultatifs et enfin les Polistinae (958 espèces) et les Vespinae (69 espèces) sont toutes eusociales (Pickett & Carpenter 2010).

La sous-famille des *Vespinae* comprend trois groupes : les guêpes (les genres *Dolichovespula* et *Vespula*), vivent principalement dans la zone tempérée de l'hémisphère nord ; un petit groupe mal connu de guêpes nocturnes (le genre *Provespa*), endémique du Sud-est asiatique ; le genre *Vespa*, composé de vingt-deux espèces de grande taille (frelons), qui est originaire des zones subtropicales et tempérées d'Asie et dont l'habitat s'étend aux régions tropicales.

Nom	Auteur
<i>Vespa affinis</i>	(Linnaeus, 1764)
<i>Vespa analis</i>	Fabricius, 1775
<i>Vespa auraria</i>	Smith, 1852
<i>Vespa basalis</i>	Smith, 1852
<i>Vespa bellicosa</i>	de Saussure, 1854
<i>Vespa bicolor</i>	Fabricius, 1787
<i>Vespa binghami</i>	du Buysson, 1905
<i>Vespa crabro</i>	Linnaeus, 1758
<i>Vespa ducalis</i>	Smith, 1852
<i>Vespa dybowskii</i>	André, 1884
<i>Vespa fervida</i>	Smith, 1858
<i>Vespa luctuosa</i>	de Saussure, 1854
<i>Vespa mandarinia</i>	Smith, 1852
<i>Vespa mocsaryana</i>	du Buysson, 1905
<i>Vespa multimaculata</i>	Perkins, 1910
<i>Vespa orientalis</i>	Linnaeus, 1771
<i>Vespa philippinensis</i>	de Saussure, 1854
<i>Vespa simillima</i>	Smith, 1868
<i>Vespa soror</i>	du Buysson, 1905
<i>Vespa tropica</i>	(Linnaeus, 1758)
<i>Vespa variabilis</i>	du Buysson, 1905
<i>Vespa velutina</i>	Lepeletier, 1836
<i>Vespa vivax</i>	Smith, 1870

Tableau 1. Les espèces du genre *Vespa*.
 Carpenter *et al.* 2011.

Le genre *Vespa* comprend 22 espèces suite à 3 modifications taxonomiques récentes : la synonymie de *Vespa auraria* Smith, 1852, avec *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, par Nguyen *et al.* (2006) et la synonymie des espèces *Vespa hekouensis* Dong & Wang, 2003, et *Vespa maguanensis* Dong, 2001, avec *Vespa analis* Fabricius, 1775, par Carpenter *et al.* (2011). Cette absence de stabilité dans la taxonomie des frelons est en partie due à l'importante variabilité phénotypique qui existe au sein des espèces de frelons. La seule phylogénie du genre, irrésolue et basée sur peu de caractères morphologiques, a été publiée par Archer en 1994.

L'Asie est le centre de diversification du genre *Vespa* : 19 des 22 espèces connues de frelons vivent entre Asie et Océanie (Carpenter & Kojima 1997). Seules deux espèces du genre *Vespa* sont naturellement présentes en Europe : *Vespa crabro* et le frelon oriental *Vespa orientalis* (Matsuura & Yamane 1990). Le frelon *V. crabro* est ubiquiste en Europe tandis que la distribution de *V. orientalis* se limite à la Bulgarie, la Grèce et le Sud de l'Italie. Ce dernier est par contre la seule espèce de frelon présente en Afrique du Nord (Carpenter & Kojima 1997 ; Rortais *et al.* 2010) (**Figure 5**).

III.2. LES VESPIDAE INVASIFS

Peu d'espèces (34 seulement des quelques 5000 connues, Beggs *et al.* 2011) de Vespidae ont été décrites comme ayant été transférées hors de leur habitat d'origine et un nombre encore plus faible peuvent être qualifiées comme envahissantes. 23 d'entre elles (68%) sont des espèces eusociales, alors que les Vespidae eusociaux ne représentent qu'environ 20% des espèces connues (Pickett & Carpenter 2010).

Les espèces de Vespidae envahissantes les mieux documentées sont : *Vespula germanica* en Patagonie et en Nouvelle Zélande, *Vespula vulgaris* en Nouvelle Zélande, *V. pensylvanica* à Hawaii, *Polistes chinensis* et *P. humilis* en Nouvelle Zélande, *P. versicolor* aux Galápagos, *P. dominula* en Amérique du Nord.

L'espèce européenne *V. germanica*, a eu une expansion très rapide en Nouvelle Zélande où elle constitue une menace pour la conservation d'arthropodes vulnérables dont ce prédateur se nourrit (Harris & Oliver 1993 ; Chapman & Bourke 2001). *V. vulgaris*, est elle aussi considérée comme un fléau en Nouvelle-Zélande. Elle se nourrit en effet des sécrétions sucrées, le miellat, provenant d'une cochenille locale, *Ultracoelostoma assimile*, qui vit sur les hêtres (Chapman & Bourke 2001 ; Beggs *et al.* 2011). Le succès invasif de ces espèces a été attribué à une structure sociale absente ou rare dans la zone d'origine : leur colonies sont monogynes et annuelles dans l'aire d'origine, au contraire, un pourcentage significatif de colonies polygynes et pérennes a été observée en Nouvelle Zelande (Plunkett *et al.* 1989 ; Leathwick & Godfrey 1996; Donovan 1992). Les guêpes polistes sont considérées comme envahissantes en Nouvelle-Zélande, aux Galápagos et en Amérique du Nord, où elles entrent en concurrence alimentaire avec des espèces locales (Causton *et al.* 2006 ; Beggs *et al.* 2011). La guêpe poliste européenne, *P. dominula* a envahi l'Amérique du Nord où elle est plus compétitive que l'espèce indigène *P. fuscatus* et représente un danger pour ce dernier (Liebert *et al.* 2006).

Plusieurs espèces de frelon ont été introduites en dehors de leur aire de distribution naturelle (Carpenter & Kojima 1997 ; Dvorak 2006), mais la plupart d'entre elles ne se sont pas établies (Beggs *et al.* 2011). Le frelon européen *V. crabro*, cependant, est maintenant bien établi en Amérique du Nord suite à son introduction volontaire aux Etats Unis, au XIX siècle, dans le cadre d'une tentative de contrôle des pullulations de

chenilles défoliatrices (Shaw & Weidhaas 1956). Il est maintenant assez largement répandu dans le nord-est des Etats Unis (Akre *et al.* 1980) et a été récemment détecté au Guatemala et au Mexique (Landolt *et al.* 2010), mais cette espèce ne semble pas causer des dommages particuliers (Beggs *et al.* 2011).

Le frelon à pattes jaunes, *Vespa velutina*, est la première espèce de frelon introduite en Europe (Beggs *et al.* 2011).



Figure 3. Comparaison entre l'espèce envahissante, le frelon à pattes jaunes, *Vespa velutina* (en haut) et le frelon d'Europe *Vespa crabro* (en bas). D'après Rome & Villemant 2011 (Fiche d'aide à l'identification du frelon à pattes jaunes).

IV. PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE : LE FRELON ASIATIQUE, *VESPA VELUTINA*

IV.1. BIOLOGIE DE L'ESPECE

Vespa velutina, ou frelon à pattes jaunes, est un insecte social d'origine asiatique. Il est d'un brun très sombre. Le thorax est entièrement brun-noir velouté et les segments abdominaux bruns, bordés d'une fine bande jaune. Seul le quatrième segment de l'abdomen est entièrement jaune orangé (**Figure 3**). Sa tête vue de face est orange et les pattes sont jaunes aux extrémités. Il mesure entre 17 et 32 mm et il est plus petit que le frelon européen *Vespa crabro*, qui lui possède un corps taché de roux, de jaune et de noir et un abdomen jaune rayé de noir (**Figure 3**).

Le frelon asiatique vit en colonies dans des nids de « papier mâché » fondés par la reine en début de saison. Une colonie ne dure qu'un an. Une nouvelle colonie est fondée par une seule reine, qui a été fécondée à l'automne précédent et est sortie de sa phase d'hibernation. Au printemps, la reine (fondatrice) ébauche un embryon de nid, pond quelques œufs et soigne quelques larves. Le développement de la nouvelle colonie commence après que les femelles stériles (appelées ouvrières) aient été élevées. La colonie se développe rapidement avec l'établissement d'une division de travaux entre la reine, qui s'occupe exclusivement de la ponte, et les ouvrières, qui s'occupent de toutes les autres tâches (prédation, construction du nid, entretien des larves). Les deux groupes sont constitués uniquement de femelles. En été, l'activité de la colonie s'accroît et la taille du nid augmente. Vers fin de la saison, le nid atteint sa taille maximale ; la reine pond des œufs destinés à devenir des individus reproducteurs (génération sexuée). Les mâles naissent via des œufs non fécondés, pondus soit par la reine, soit par les femelles non fécondées et ils sont haploïdes. Les femelles naissent d'œufs fécondés et sont diploïdes. Un déclin rapide de la colonie commence avec la mort de la fondatrice entre la fin de l'été et le début de l'automne, une période durant laquelle le nombre d'ouvrières atteint un maximum pour l'année. Seules les femelles fécondées survivront et se mettront en phase de diapause en attendant le printemps. Dans les pays tropicaux de la zone d'origine, il n'y a pas de phase de diapause car la température est suffisamment

élevée toute l'année. Donc quel que soit le moment de l'année, on peut trouver en Asie des colonies à tout stade de développement. (Foster *et al.* 1999 ; Takahashi *et al.* 2004).

IV.2. DESCRIPTION DES NIDS DE *V. VELUTINA*

Le nid du Frelon asiatique est formé de plusieurs rayons horizontaux (galettes) de cellules ouvertes vers le bas et reliés par un pédoncule (**Figure 4**). Chaque nid est entouré d'une enveloppe faite de fibres végétales triturées et mélangées avec de la salive et percée d'un orifice latéral. L'enveloppe externe est ornée de rayures plus ou moins foncées selon le matériel végétal utilisé pour la fabrication de la pâte. Les nids sont aériens et sont généralement situés très hauts dans les arbres. Ils atteignent souvent à la fin de l'été plus de 50 cm de diamètre (80 cm pour les plus gros) (Rome *et al.* 2009) et peuvent renfermer entre 5 et 7 galettes (parfois 11 dans les nids les plus gros) et plusieurs milliers d'individus (6000 individus produits par nid et par saison en moyenne mais plus de 15 000 dans les colonies de plus grande taille) (Villemant *et al.* 2011b). Jusqu'à 550 futures reines peuvent être produites par colonie (Villemant *et al.* 2011b).

Dans certains cas, il a été constaté la formation d'un certain nombre de « nids satellites » à proximité de nids qui ne sont plus actifs ou qui ont subi des dommages (Villemant *et al.* 2008).



Figure 4. Le nid du frelon a pattes jaunes, *Vespa velutina*. Photos de P. Goetgheluck (<http://www.goetgheluck.com>) A. Nid de frelon perché sur un arbre ; B Un nid de frelon de grande taille ; C Galette de nid de frelon ; D Section d'une galette ; E Différents stades de développement de l'insecte. Larve/nymphé dans son opercule ; adulte ; larve ; nymphé.

IV.3. REGIME ALIMENTAIRE ET ECOLOGIE DE LA PREDATION

V. velutina, comme les autres Vespinae, est un prédateur et/ou charognard opportuniste qui se nourrit d'une grande variété d'insectes et d'araignées, ainsi que de viande provenant de carcasses de vertébrés (Edwards 1980 ; Matsuura & Yamane 1990).

Sa nourriture se compose de deux catégories : liquides et solides. Les premiers consistent en glucides consommés principalement par les ouvrières, tandis que les deuxièmes consistent en boulettes de chair consommées entièrement par les larves.

Il y a des preuves de spécialisation alimentaire entre les espèces de Vespinae. Par exemple, *Vespa tropica* se nourrit presque exclusivement par des raids dans des nids de guêpes Polistinae ; *Vespa mandarinia* effectue fréquemment d'impressionnants raids de groupe sur les colonies d'abeilles (Matsuura 1984). L'analyse des boulettes alimentaires collectées entre 2008 et 2010, montre que le spectre de proies capturé par *V. velutina* est assez diversifié (Villemant *et al.* 2011c). Il comprend une très grande variété d'insectes, avec une nette préférence pour les hyménoptères sociaux (abeille domestique : 37%, guêpes communes : 18%) et des diptères (34%) essentiellement floricoles (Syrphidae) et nécrophages (Calliphoridae, Muscidae) (Villemant *et al.* 2011c). Par ailleurs, le spectre de proies du frelon varie en fonction de l'environnement du nid : urbanisé, agricole ou forestier. En milieu urbanisé où la diversité des proies disponibles est la plus faible, la prédation du frelon sur les abeilles domestiques apparaît plus forte : elles représentent plus du 70% des proies (Muller *et al.* 2009 ; Beggs *et al.* 2011).

IV.4. HISTOIRE DE L'INTRODUCTION DE *V. VELUTINA* EN FRANCE

Vespa velutina, est un frelon invasif provenant du sud-est de l'Asie. Il est répandu du Népal et du nord de l'Inde jusqu'à l'est de la Chine, la Péninsule Indochinoise et l'Archipel Indonésien (Villemant *et al.* 2011c). Dans les années 2000, il a été signalé en Corée (Jung *et al.* 2008; Choi *et al.* 2011) où son expansion est limitée très probablement par la compétition exercée par les six autres espèces de frelons locales (Villemant *et al.* 2011a).

Il est arrivé en France au plus tard en 2004, date de la découverte des premiers individus par un producteur de bonzaïs de Pinel-Hauterive, Lot-et-Garonne, qui aurait

vu voler des frelons de couleur brune dès l'été 2004. Il aurait reconnu l'espèce qu'il avait remarquée peu de temps auparavant, lors d'un voyage de prospection dans la province chinoise du Yunnan (Villemant *et al* 2006). En automne 2004, après la chute des feuilles, il aurait découvert deux nids sphériques de frelon et les aurait détruits à coups de fusil. En 2005, en voyant voler à nouveau des frelons, il en a capturé et, en 2006, il a envoyé un spécimen au Muséum National d'Histoire Naturelle qui a confirmé son identification (Haxaire *et al.* 2006 ; Villemant *et al.* 2006). L'hypothèse la plus vraisemblable de son arrivée en France impliquerait l'importation de poteries chinoises en provenance de Yixing, ville de la province du Jiangsu, renommée à l'international pour la production de théières en terre cuite. Le producteur de bonzaïs s'approvisionnait depuis plusieurs années en pots auprès d'artisans chinois un peu partout dans le pays mais à 80% de Yixing (journal SUD-OUEST, 25 septembre 2010). Il est donc vraisemblable que ce frelon asiatique ait été introduit accidentellement dans les cartons de poteries chinoises que ce producteur importait régulièrement (Villemant *et al.* 2006). En effet, puisque le transport de la marchandise par bateau ne dure qu'un mois, le transport de fondatrices hivernantes à l'intérieur des cartons aurait pu se faire sans compromettre leur survie, dans le cas où elles auraient été expédiées au cours de l'hiver (Villemant *et al.* 2006).

Depuis sa découverte, l'expansion du frelon à pattes jaunes a été cartographiée grâce aux signalements enregistrés dans la base de données de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (<http://inpn.mnhn.fr/>). Moins de deux ans après sa découverte, en 2006, il était déjà présent dans 13 départements du sud-ouest de la France, 21 en 2007 (avec un nid signalé en Côte d'Or, à 300 Km du front d'invasion), 24 en 2008 (avec un nid en Ille-et-Vilaine, Bretagne, à 200 km du front), 32 en 2009 (avec un nid détruit au Blanc-Mesnil, Seine-Saint-Denis), 39 en 2010 (avec des frelons capturés près de Nice, Alpes-Maritimes) et 48 en 2011 (Villemant *et al* 2011b). Actuellement la zone envahie est d'environ 270 000 Km² (50% du territoire Français) et la progression du front d'invasion est d'environ 100 Km par an (Rome *et al.* 2012, sous presse) (**Figure 6**).

Le frelon *V. velutina* a été aussi signalé en 2010 en Espagne dans le Pays Basque espagnol et en Navarre (Castro & Pagola-Carte 2010; López *et al.* 2011). En 2011 plusieurs individus de *V. velutina* ont été capturés au Portugal, à Viana de Castelo

(Grosso-Silva & Maia 2012) et un mâle à été signalé en Belgique (J. D'Haeseleer, comm. pers. ; Villemant *et al.* 2011b) (**Figure 6**).

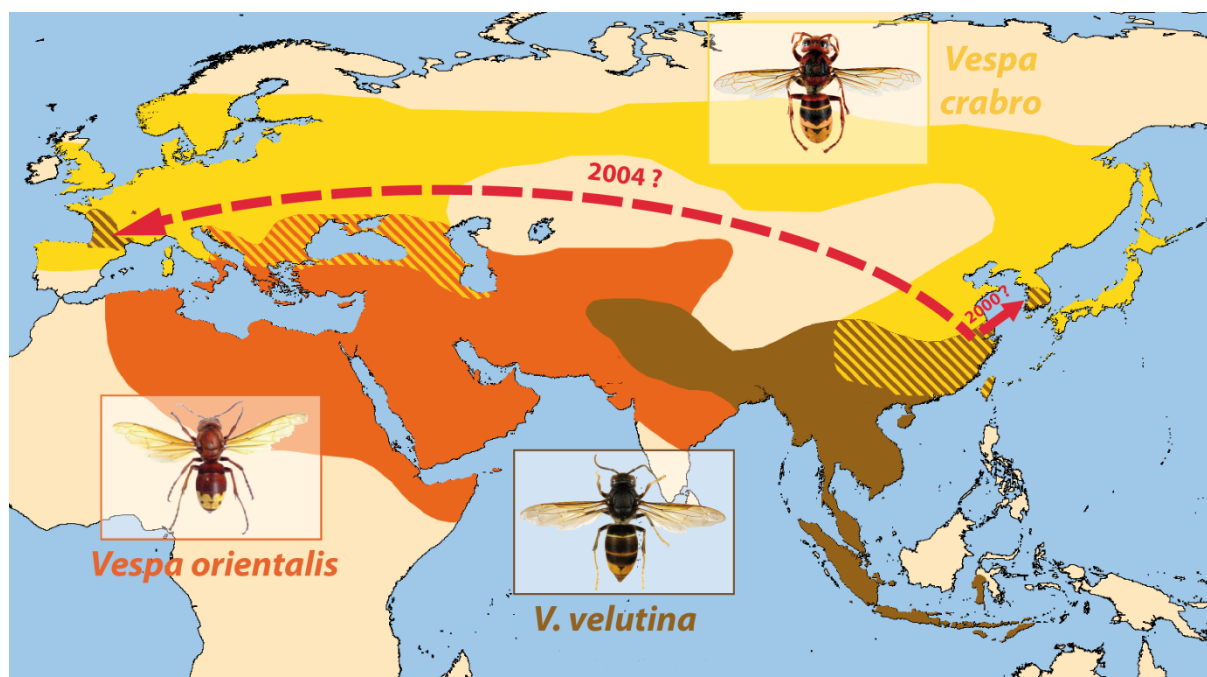


Figure 5. Carte de répartition des deux espèces de frelon naturellement présentes en Europe, *V. crabro* et *V. orientalis*, et de l'espèce envahissante, *V. velutina*. Les parties hachurées correspondent à des zones où deux espèces sont présentes (hors sud-est asiatique, Rome *et al.* 2011).

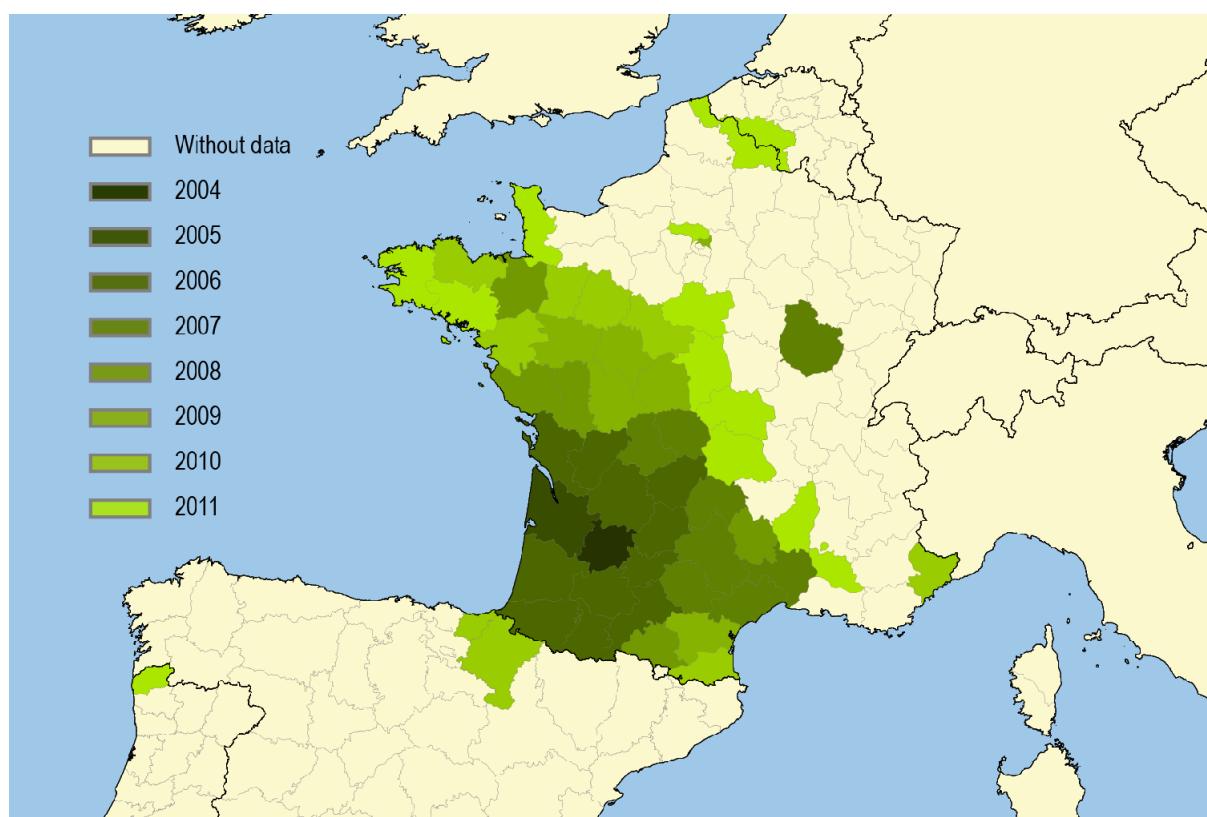


Figure 6. Carte de répartition de *Vespa velutina* en France et dans les autres pays européens récemment envahis (Rome *et al.* 2012, sous presse).

IV.5. IMPACT DE L'INTRODUCTION DU FRELON *V. VELUTINA*.

Le frelon à pattes jaunes, *V. velutina*, après son introduction, s'est rapidement fait connaître des habitants du sud-ouest de la France par ses nids de taille imposante ainsi que par sa prédisposition à chasser les abeilles devant les ruches. A cause de son activité de prédation et de la taille de ses nids, au moins trois fois plus populeux que ceux du frelon d'Europe *Vespa crabro*, *V. velutina* exerce sur les ruchers une pression beaucoup plus importante que le frelon indigène (Villemant *et al.* 2008). En France, il a acquis rapidement le statut de prédateur majeur d'abeilles dans le milieu apicole. Compte tenu de l'importance quantitative des proies capturées au cours d'une saison par une colonie ayant atteint la maturité, l'impact du frelon sur les populations d'abeilles représente un coût pour l'apiculture en termes de réduction de production de miel et de perte de colonies, et pourrait avoir aussi des conséquences sur les services de pollinisation que les abeilles assurent (Muller *et al.* 2009 ; Villemant *et al.* 2011c).

Les nids du frelon asiatique sont souvent situés à proximité des habitations, dans les haies et sur des bâtiments et ils représentent donc un risque potentiel pour l'homme. En France, plusieurs cas d'hospitalisations et un cas de décès ont été attribués au frelon asiatique. Bien qu'aucune augmentation significative de cas de piqûres d'hyménoptères n'ait été recensée dans les départements infestés par *V. velutina* (De Haro 2010), la probable extension de sa distribution à travers la France et les pays voisins pourrait aussi constituer une menace pour la santé publique.

En France, le frelon à pattes jaunes représente aussi une menace indirecte pour la biodiversité à cause de l'impact négatif des campagnes incontrôlées de piégeage non sélectif et du mode de destruction des nids. Les pièges à appâts tuent en effet de nombreuses espèces non-cibles, notamment les guêpes communes, le frelon d'Europe, des mouches ou de nombreux papillons, tandis que les nids traités à l'insecticide et laissés en place menacent l'avifaune (Rome *et al.* 2011 ; Villemant *et al.* 2011c).

Un travail de modélisation écologique a permis d'estimer que la plupart des pays d'Europe sont des territoires d'invasion potentielle, et en particulier la probabilité d'acclimatation de l'espèce est plus forte sur les côtes atlantiques, du nord du Portugal à l'Irlande, l'Angleterre et les Pays-Bas au nord, et à l'Italie du nord vers le sud (Villemant

et al. 2011a) (**Figure 7**). L'acclimatation d'une nouvelle espèce de Vespidae en Europe pose donc de nombreuses questions, notamment sur la rapidité et l'étendue potentielle de sa dispersion. Les connaissances sur son potentiel de dispersion et ses capacités d'adaptation à nos écosystèmes sont très limitées.

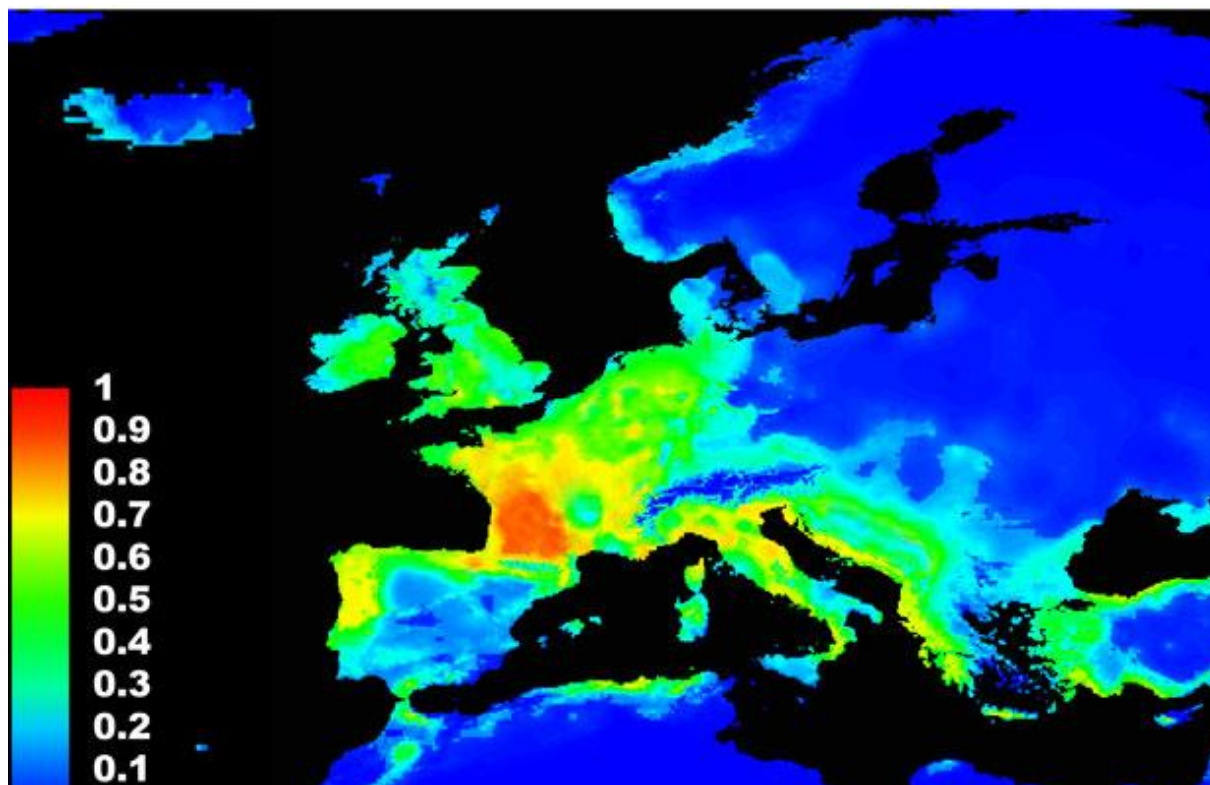


Figure 7. Carte des potentialités d'expansion du frelon asiatique en Europe. . Les zones rouges correspondent aux zones les plus propices. D'après Villemant *et al.* (2011a).

IV.6. LE PROGRAMME « ÉTUDE DE LA BIOLOGIE, DU COMPORTEMENT ET DE L'IMPACT DE *VESPA VELUTINA* SUR LES ABEILLES EN VUE D'UN CONTRÔLE SPÉCIFIQUE ».

Dans sa zone d'origine, le frelon à pattes jaunes, a bénéficié de quelques études portant sur son comportement de prédation, mais très peu de travaux scientifiques sur sa biologie et son écologie étaient disponibles au moment de l'introduction de l'espèce en France. Ainsi, les potentialités de colonisation de cette espèce et les conséquences de son introduction n'étaient pas connues.

Dans ce contexte, un programme de recherche, intitulé « *Etude de la biologie, du comportement et de l'impact de Vespa velutina sur les abeilles en vue d'un contrôle spécifique* », financé par France Agrimer (Programme communautaire d'aide à l'apiculture européenne EC 797, 2008-2011), a été initié en 2008. Ce projet, coordonné par Claire Villemant (MNHN), voyait la collaboration de 4 partenaires : le Muséum National d'Histoire Naturelle (UMR7205 MNHN-CNRS et INPN) le laboratoire LEGS (UPR 9034 CNRS et UR 072 IRD) de Gif-sur-Yvette, l'INRA de Bordeaux (Unité de Santé Végétale) et l'IRBI de Tours. Il avait pour objectif de répondre au mieux aux multiples questions qui se posent sur la biologie et le comportement de *Vespa velutina* afin de mieux maîtriser son impact sur l'apiculture et son expansion en France. Plus spécifiquement, le programme visait à : i) approfondir les connaissances sur la biologie de l'insecte (régime alimentaire, taille et évolution des nids, comportement de prédation, structure sociale) ; ii) suivre la dynamique de l'invasion et les fluctuations de la population ; iii) déterminer les conséquences de son introduction sur les colonies d'abeilles et sur la biodiversité ; et iv) mettre au point des techniques de piégeage ciblant spécifiquement *V. velutina*.

V. OBJECTIFS DE LA THESE

Dans le cadre de ce programme de recherche, ma thèse avait pour objectif d'étudier les différentes caractéristiques de l'espèce, tant génétiques que comportementales, pouvant permettre d'expliquer le succès de son invasion en France et prédire ainsi ses potentialités d'expansion en Europe.

Pour ce faire nous avons choisi d'adopter une démarche multidisciplinaire, qui s'est articulé autour de trois axes :

Dans un premier temps, j'ai caractérisé, grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires, la diversité génétique de la lignée envahissante de *V. velutina* et je l'ai comparée à celle de plusieurs populations de l'aire d'origine, afin de **retracer l'histoire de son introduction en France**. De manière plus détaillée, cette étude avait pour but de mieux comprendre et caractériser le ou les événements d'introduction du frelon en recherchant l'origine géographique des individus importés, en déterminant le nombre d'événements d'invasion et en estimant l'importance quantitative des populations introduites.

Dans un deuxième temps, afin de définir plusieurs des paramètres nécessaires à cette étude et d'en expliciter les résultats, je me suis intéressés à la **caractérisation génétique des colonies** et à la **biologie de la reproduction** de l'espèce, obstacle majeur dans les premières phases de l'invasion, afin de mieux estimer la diversité génétique des femelles sexuées introduites et d'évaluer les capacités de reproduction du frelon en France en prenant en compte l'hypothèse d'une baisse de diversité associée à la phase d'introduction,

En complément à ces démarches, j'ai entrepris une **étude comportementale** afin de comprendre si *Apis mellifera* défend ses colonies contre le nouveau prédateur *Vespa velutina* et dans ce cas comment elle opère, ceci afin de déterminer l'impact de la prédation exercée par le frelon sur l'activité des abeilles.

Après cette présentation générale du contexte de la thèse, la suite du manuscrit sera dédiée aux résultats de ces 3 axes d'étude. Dans une dernière partie, une discussion générale et une conclusion seront présentées, ainsi que les perspectives qui résultent de ce travail de thèse.

PARTIE I

Caractérisation génétique de la lignée invasive de Vespa velutina

VI. CARACTERISATION GENETIQUE DE LA LIGNEE INVASIVE DE *V. VELUTINA*

La présente étude a pour objectifs de caractériser, grâce à une approche moléculaire, les principaux traits de l'histoire de l'introduction de *V. velutina* en France et de mieux comprendre la dynamique de son invasion. Trois questions majeures ont été développées au cours de cette étude :

- 1) Quel est l'origine géographique de la lignée de *V. velutina* introduite en France ?
- 2) Est-ce que l'invasion de la France dérive d'un phénomène d'introduction unique ou est elle issue de plusieurs introductions indépendantes depuis l'Asie (estimation du nombre de propagules) ?
- 3) Quel est le nombre de fondatrices impliqués dans la ou les introductions (estimation de la taille de propagules) ?

Connaitre l'origine d'une espèce envahissante a avant tout un intérêt appliqué parce que cette connaissance peut fournir des indications utiles pour le développement de méthodes d'éradication ou de contrôle. Grâce à la localisation des populations sources, il est possible d'identifier des agents potentiels de lutte biologique ainsi que les voies d'introduction (Downie 2002 ; Gwiazdowski *et al.* 2006). Si une zone géographique ou un moyen de transport à l'origine de l'introduction est identifié, des mesures de surveillance peuvent être mises en place. En effet, la prévention des introductions est considérée comme la méthode plus efficace pour limiter les invasions biologiques (Mack *et al.* 2000).

En outre, la connaissance de l'origine d'une invasion a aussi un intérêt fondamental. La comparaison des populations envahissantes avec les populations d'origine permet d'identifier d'éventuels changements évolutifs (Keller & Taylor 2008) et de contribuer à la compréhension générale des mécanismes évolutifs et écologiques impliqués lors des invasions biologiques. L'estimation de la fréquence avec laquelle une espèce est introduite dans une zone, le nombre d'individus à chaque introduction, et le patron de propagation consécutif à l'introduction permettent de déterminer les mécanismes qui ont favorisé l'invasion et ont permis le succès de l'espèce dans l'aire d'introduction.

VI.1. CHOIX ET DEVELOPPEMENT DES MARQUEURS MOLECULAIRES EN VUE DES ETUDES DE CARACTERISATION GENETIQUE DES POPULATIONS DE *V. VELUTINA*

Pour reconstruire l'histoire de l'invasion de *V. velutina* en France, nous avons donc effectué une étude phylogéographique à l'aide du marqueur mitochondrial COI et de 22 loci microsatellites.

L'ADN mitochondrial a été choisi car il possède certaines propriétés grâce auxquelles il constitue un marqueur idéal de la colonie : tous les individus de la colonie ont le même haplotype, en conformité avec la transmission maternelle. Ainsi, ce marqueur devrait permettre de déterminer l'origine maternelle des colonies et de détecter avec précision, parmi les populations de l'aire de répartition naturelle de l'espèce, l'origine géographique des haplotypes introduits. Le choix de la région mitochondriale COI est justifié par le fait qu'il s'est plusieurs fois révélé informatif dans la reconstruction de l'histoire de l'invasion d'autres insectes sociaux (Caldera *et al.* 2008 ; Cremer *et al.* 2008 ; Mikheyev 2008).

Les microsatellites sont des marqueurs à hérédité biparentale. Les femelles et les reines d'une génération donnée possèdent toutes, à chaque locus, un allèle paternel et un allèle maternel. Ces marqueurs sont hautement polymorphes et ont été choisis pour cette raison : ils représentent des outils particulièrement performants pour estimer le niveau de variabilité et de structuration génétique à l'échelle de la population.

Aucune étude génétique n'ayant été réalisée sur *V. velutina* auparavant, cette étude a nécessité la mise au point de marqueurs microsatellites. Dans une première étape, nous avons testé des loci mis au point pour des espèces d'hyménoptères Apidae et Vespidae comme *Apis mellifera*, *Vespa mandarinia*, *Vespula vulgaris*. 117 marqueurs microsatellites ont été testés au total, mais seulement 7 ont été amplifiés avec succès et se sont montrés polymorphes chez *V. velutina*. Nous avons donc entrepris une recherche de marqueurs microsatellites spécifiques à *V. velutina*. La méthodologie relative à la recherche, au développement et à la mise au point des marqueurs microsatellites a requis l'utilisation de techniques de l'ADN recombinant et s'est déroulé en cinq étapes principales: isolation et digestion de l'ADN génomique, insertion des fragments ainsi obtenus dans un vecteur et clonage (création d'une banque génomique partielle),

criblage de la banque génomique, séquençage des clones positifs, choix des amorces et mise au point des conditions d'amplification par PCR.

Le screening a été conduit avec succès et 500 clones positifs (contenant des motifs microsatellite) ont été isolés. Le séquençage de 120 de ces clones a permis d'identifier 15 nouveaux locus qui sont polymorphes chez *V. velutina*. Ces résultats ont été publiés dans la revue *Conservation Genetic Resources* et sont présentés dans l'**article 1**.

ARTICLE 1 DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR THE YELLOW-LEGGED ASIAN HORNET, *VESPA VELUTINA*, A MAJOR THREAT FOR EUROPEAN BEES.

Conservation Genet Resour
DOI 10.1007/s12686-011-9525-1

TECHNICAL NOTE

Development of microsatellite markers for the yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina*, a major threat for European bees

M. Arca · C. Capdevielle-Dulac · C. Villemant ·
F. Mougél · G. Arnold · J.-F. Silvain

Received: 2 September 2011 / Accepted: 5 September 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract We report the characterization of fifteen microsatellite markers in *Vespa velutina*, an invasive hornet from Asia that has been unintentionally introduced in France before 2005. It is expanding rapidly, covering one third of the French territory and northern Spain, and causes severe losses to honeybee colonies. An enrichment protocol was used to isolate microsatellite loci, and polymorphism was explored in an invasive population from France and in a population from the native mainland location in China. These markers showed a number of alleles per locus and per population ranging from 1 to 11, and expected heterozygosities ranging from 0.151 to 0.891. These polymorphic markers will be useful to identify the source of the invading population and to discover the invasion pathways.

Keywords Yellow-legged Asian hornet · *Vespa velutina* · Invasive species · Microsatellites · Population genetics

M. Arca · C. Capdevielle-Dulac · J.-F. Silvain
IRD, UR 072, Laboratoire Evolution, Génétique et Spéciation,
CNRS UPR 9034, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

M. Arca · C. Capdevielle-Dulac · F. Mougél · G. Arnold ·
J.-F. Silvain
Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France

M. Arca (✉) · F. Mougél · G. Arnold
Laboratoire Evolution, Génome et Spéciation, bâtiment 13,
Campus CNRS Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette,
France
e-mail: mariangela.arca@legs.cnrs-gif.fr

C. Villemant
UMR 7205 CNRS-MNHN, Muséum National d'Histoire
Naturelle, 45 rue Buffon, CP 50, 75005 Paris, France

The yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina* (Hymenoptera, Vespidae), is a major predator of honeybees *Apis mellifera* and its accidental introduction in France from Asia is causing important damages on the local honeybee populations.

Vespa velutina was reported for the first time in France in 2005 (Haxaire et al. 2006; Villemant et al. 2006). It spreads out across ca. 190,000 km² within 6 years (Villemant et al. 2011). Its arrival in northern Spain was reported in 2010 (Castro and Pagola-Carte 2010). Its eradication is now impossible and its expansion in Europe is soon to be expected (Villemant et al. 2011).

Information on the genetic variability between individuals of *V. velutina* from France and Asia is necessary to describe the history of the invasion of this species and to estimate its potential geographic expansion in the future.

In this study, we isolated a set of polymorphic microsatellite loci that will be useful to better understand the invasion pathways of *V. velutina* and to predict its dispersal in Europe.

Two microsatellite-enriched libraries were prepared following the Duthech et al. (2000) protocol with modifications by Giraud et al. (2002). DNA (≈ 50 ng) was digested with two restriction enzymes: (Library1: *Dra*I; Library2: *Rsa*I). The DNA fragments were ligated using the adaptators MLU1A 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' and MLU1B 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCAC-3' and were then amplified by PCR. Microsatellite sequences were selected using biotinylated TC(10) and TG(10) probes and captured by streptavidin Magnesphere paramagnetic particles (Promega). Enriched DNA was cloned using the pGEM-T Easy Vector (Promega). The recombinant clones were transferred onto nylon membranes (Hybond-N+; Amersham) and screened by hybridization using the same stocks of dinucleotide digoxigenin end-labelled oligonucleotide probes

Table 1 Characteristics of fifteen microsatellite loci isolated in *Vespa velutina*

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Ncycles	Locus ID/motif/ genbank accession no.	Nall	Zhejiang-China				Gironde-France			
						N	H _e	H _e	HW- Pvalue	N	H _e	H _e	HW- Pvalue
R4-26	F: CCAGGACGATCAGTATCAAGG R: TCGAAAGACAAATAAAAGAAACGA	(CT) ₂₁	45	JN607422	11	229-272	5	0.615	0.683	0.681	3	0.556	0.001
D2-185	F: CCGATTAAACCGCGATGTA R: GCGGACGACAACTTTCATTA	(CT) ₁₈	45	JN607423	9	208-228	7	0.765	0.774	0.192	3	0.649	0.085
R4-100	F: TCGGTAATTCAGATTATTAAGTGAAAG R: CTCACGCATGATCCCTATCG	(AC) ₁₉ (CT) ₆	45	JN607424	17	154-194	11	0.75	0.891	0.311	4	0.243	0
R4-114	F: GACGGCACGTCGTGTTAAAT R: GCGAATAAAGTCTTCCTTCCA	(TC) ₁₅	45	JN607425	11	122-152	8	0.75	0.754	0.937	5	0.622	0.258
D3-15	F: CGAAGGATTTCTCTCGGACT R: TCGGTGAAACAAATAGGTG	(TC) ₁₅	45	JN607426	10	157-180	8	1	0.833	0.681	4	0.676	0.137
R1-36	F: GGATTATACACCTTCGACCATTTT R: TCGCGAAGGTTAAAGCAAT	(CT) ₁₄	30	JN607427	11	99-119	6	0.529	0.797	0.079	2	0.432	0.727
R1-75	F: TCGATTCTGCGAAATTCACA R: TATCGGAAGGTGAAACGAA	(AC) ₁₄	30	JN607428	5	142-154	4	0.588	0.519	0.784	3	0.622	0.238
R1-77	F: ACGTTCTAAGAGCCGTGCAT R: AATTGGACAAATCCGCTCTG	(CT) ₁₅ (CTT) ₅	30	JN607429	8	241-255	6	0.706	0.777	0.126	2	0	0.151
R1-80	F: CATCATCGGCACATACAAAA R: TGGAAAGAAATTAACGAGTTT	(GT) ₁₉	40	JN607430	24	100-174	11	0.647	0.856	0.11	2	0.459	0.742
R4-33	F: TTGTCCTTCGGGAAACAAT R: TGTTGCGTGAAAGAGAGAGTG	(GA) ₂₀	30	JN607431	14	199-225	9	0.813	0.851	0.4	2	0.5	0.507
R1-137	F: GCACCAAGGAACGAGGTATG R: TCGTCGAGATATTGTAGGAAAA	(GA) ₂₃	30	JN607432	16	168-202	8	0.765	0.856	0.315	3	0.686	0.909
R1-169	F: GACGGTCGGCTGTTAGGATA R: CGAGCGCTTCTTTAGTGAG	(CT) ₂₇	30	JN607433	8	148-165	5	0.75	0.677	0.852	2	0.222	0.226
D2-142	F: AATGATTTCCAACTCAAGCGTTA R: GGTACATTCGAGATAAAATGGACTA	(CT) ₁₄	40	JN607434	16	147-182	9	0.938	0.883	0.751	1	This locus is monomorphic	
R3-115	F: TGATTAGATCTTCGACGTTACAC R: TTTGTGTTTGCCCGTAGTCA	(CT) ₁₆	40	JN607435	15	140-184	8	0.692	0.868	0.308	3	0.606	0.911
R1-158	F: GCTCCTAGACGAGGACAACC R: ATCGTGTTCGCCCTGAAGAAT	(CA) ₂₀ (CG) ₅	30	JN607436	9	153-174	8	0.813	0.843	0.692	3	0.583	0.898

Nall total number of alleles, ASR allele size range, N number of alleles in each population, H_e observed heterozygosity, H_e expected heterozygosity, HW-Pvalue P-values for the Hardy-Weinberg exact test

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

Conservation Genet Resour

(Roche Diagnostics GmbH). 130 positive clones were amplified by PCR and were sequenced with the ABI Prism 3130 automatic sequencer. The sequences were aligned using BioEdit, version 7.0.9 (Hall 1999) to check if some sequences shared similarities between flanking regions. Primers were designed using Primer3 software (Rozen and Skaletsky 1998) for 43 sequences.

Initially, the different combinations of primers designed for the 43 loci were tested in six individuals from different countries (two from China, two from France, one from Vietnam and one from Indonesia). Reactions were performed with 45 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s (with an initial step of 94°C for 10 min and a final step of 72°C for 10 min). Each amplification contained 5–10 ng of genomic DNA, 1X Buffer, 3 mM MgCl₂, 0.4 mM of dNTPs, 0.4 μM of each primer, and 0.25 U of GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). The PCR products were separated in 5% agarose gels, to check if the loci were polymorphic or not. Polymorphic loci were tested on 21 workers collected in one invasive population (Gironde district, France) and 18 workers from one native population (Zhejiang province, China). The PCR protocol was the same except that we used fluorescent forward primers for the PCR and we reduced the number of cycles for some loci (see Table 1). Microsatellite loci were analyzed on an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems); the lengths of PCR products were determined using Genemapper software (Applied Biosystems).

Observed and expected heterozygosities and mean number of alleles per locus were estimated using Arlequin 3.01 (Excoffier et al. 2005) and are shown in Table 1. Null allele frequencies were estimated using Microchecker 2.2.3 software (Van Oosterhout et al. 2004). The linkage disequilibrium for each locus and location was tested using Genepop (Rousset 2008). Adjustment for multiple testing was performed applying Benjamini and Hochberg (1995) false discovery rate procedure.

Fifteen polymorphic loci with unambiguous allelic pattern were selected for further population studies. Primer sequences and PCR conditions are given for each selected locus in Table 1. The sequences of the fifteen loci have been deposited in the GenBank database (Accession nos. JN607422–JN607436). In the French sample, the number of alleles per locus and the expected heterozygosity ranged from one to four, and from 0.151 to 0.678, respectively. Loci developed here were more polymorphic for the native eastern Chinese population, with the number of alleles ranging from 4 to 11 and levels of expected heterozygosity per locus varying between 0.519 and 0.891 (Table 1).

No significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium over all loci was found for the French population, except loci *R4-100* and *R1-77* showing a significant heterozygote deficit. Similarly, in the Chinese population, all

loci were at HWE. Such a deficiency in heterozygotes may result from the presence of null alleles. This seems to be the case for the two loci *R4-100* and *R1-77* from the French population. Despite significant heterozygote deficit at two loci, both French and Chinese populations were at HWE. No evidence for linkage disequilibrium was detected both in French and Chinese samples.

The relatively low number of alleles for each locus in the French populations can likely be linked to a bottleneck experienced by the invading population.

Our results show that the microsatellite loci isolated from *V. velutina* will be useful for population genetic studies in both native and introduced populations of this species. These markers are expected to provide important insight into the structure of populations, which is promising for future analyses intended to understand invasion routes and to decipher the factors responsible for the success of invasions.

Acknowledgments This work was supported by France AgriMer (Programme communautaire pour l'Apiculture, 2008–2011). The authors are grateful to Amandine Fossoud for technical assistance, and Prof. Chen Xue-xin, Dr. Tan Jiang-li from the University of Zhejiang (Hangzhou, China), Frank Muller, Adrien Perrard and Quentin Rome from Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris, France) for providing samples from China and France.

References

- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B* 57:289–300
- Castro L, Pagola-Carte S (2010) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae), recolectada en la Península Ibérica. *Heteropterus Revista de Entomología* 10:193–196
- Duthech C, Amsellem L, Billote N, Jarne P (2000) Characterization of (GA)_n microsatellite loci using an enrichment protocol in the neotropical tree species. *Vouacapoua Americana*. *Mol Ecol* 9:1433–1449
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47–50
- Giraud T, Fournier E, Vautrin D et al (2002) Isolation of eight polymorphic microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *Mol Ecol Notes* 2:121–123
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp Ser* 41:95–98
- Haxaire J, Bouguet J-P, Tamisier J-PH (2006) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hymenoptera, Vespidae). *Bulletin de la Société entomologique de France* 111(2):194
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103–106
- Rozen S, Skaletsky HJ (1998) Primer 3. Available from <http://www.frodowimtedu/primer3/>
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

Conservation Genet Resour

Villemant C, Haxaire J, Streito J-C (2006) Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). Bulletin de la Société Entomologique de France 111: 535–538

Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, Muller F, Gargominy O, Jiguet F, Rome Q (2011) Predicting the invasion risk by the alien

bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. Biol Conserv. doi:[0.1016/j.biocon.2011.04.009](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.04.009)

VI.2. MATERIEL BIOLOGIQUE UTILISE

Le matériel à disposition pour notre étude est constitué d'individus de *V. velutina* provenant de France et d'Asie (Indonésie, Vietnam, Chine) conservés dans de l'éthanol à 90 %. Ce matériel a été fourni par l'équipe du MNHN (C. Villemant, Q. Rome, A. Perrard, F. Muller), par de chercheurs étrangers (M. Dvorak, J.L. Rennesson, P. Tripotin, T. Ken, Chen, X.X., Tan J.L.) et par plusieurs apiculteurs et associations apicoles françaises. Un effort d'échantillonnage plus important a été effectué en Chine, dans la zone supposée d'origine et en particulier à Yixing, site d'où provenaient les poteries chinoises importées en Lot et Garonne, grâce à une mission conduite par l'équipe du MNHN. L'échantillon a été complété par des individus issus d'une autre population invasive de frelon établie en Corée (Jung C., School of Bio-ressource Sciences, Andong, Corée) dans le cadre d'une collaboration avec Claire Villemant et son équipe.

Pour les analyses génétiques seules les femelles ont été utilisées. En effet, cette espèce étant haplo-diploïde, seules les femelles possèdent deux copies de chaque gène, alors que les mâles n'en possèdent qu'une seule. Ceci permet d'être sûr que les individus homozygotes le sont bien. Pour l'étude populationnelle un seul individu pas nid a été analysé. Quand les échantillons étaient collectés au filet ou venaient d'un piège, un frelon par site de collecte a été utilisé pour les analyses. La distance minimale entre sites de collecte a été établie à 10 km.

VI.3. ANALYSE GENETIQUE DES POPULATIONS ET RECONSTRUCTION DE L'HISTOIRE DE L'INVASION

Pour retracer l'histoire de l'invasion de *V. velutina* en France nous avons utilisé deux types d'approches.

Dans un premier temps nous avons utilisé des méthodes d'analyse classiques basées sur les divergences de séquences et les fréquences alléliques (arbres phylogénétiques, arbre de distance génétique entre individus, F_{st}), sur la vraisemblance d'assignation (GENECLASS), et sur de modèles bayesiens de calcul de vraisemblances (STRUCTURE). Toutefois, toutes ces méthodes présentent des limites. Premièrement, elles nécessitent que l'échantillonnage soit exhaustif (Guillemaud *et al.* 2010). Deuxièmement, elles ne

fournissent pas de support statistique permettant de mesurer quantitativement la confiance qu'on peut accorder à un résultat plutôt qu'à un autre. Enfin, elles ne prennent pas en compte les différentes forces qui affectent la diversité génétique au moment de l'invasion (Estoup & Guillemaud 2010). En particulier, elles ne tiennent pas compte du fait que la dérive génétique liée aux effets de fondation modifie aléatoirement les fréquences alléliques et fait augmenter la différenciation génétique entre une population envahissante et la population d'origine (Estoup & Guillemaud 2010).

Suite à toutes ces considérations, nous avons donc associé aux méthodes d'analyses classiques une méthode récemment développée, l'Approximate Bayesian Computation, ABC (Beaumont *et al.* 2002). L'utilisation de cette méthode présente plusieurs avantages : *i*) elle permet d'inclure des données historiques et biologiques en plus des données génétiques ; *ii*) elle s'est révélée très puissante dans la reconstruction des scénarios d'invasion, car elle permet de prendre en compte l'existence de goulots d'étranglement (Pascual *et al.* 2007), d'hybridation (Verdu *et al.* 2009), ou de population non échantillonnées (Lombaert *et al.* 2011) et permet d'estimer le nombre de fondateurs d'une population (Bonhomme *et al.* 2008 ; Lye *et al.* 2011) ; *iii*) elle permet d'évaluer la qualité des estimations à travers le calcul des erreurs de type I et II associées aux résultats obtenus.

ABC est une méthode d'inférence bayésienne approchée qui a pour objectif d'obtenir, à travers la simulation d'un grand nombre de jeux de données, un résultat qui soit le plus proche possible des observations (Beaumont 2010 ; Bertorelle *et al.* 2010 ; Csillery *et al.* 2010). A partir des données observées D (par exemple des génotypes multilocus individuels) pour un paramètre θ qu'on veut estimer, l'expérimentateur choisit une loi *a priori* (un scénario) et lance des simulations pour obtenir des paramètres simulés selon cette loi. Donc, en connaissant les données observées D , la simulation permet de rechercher la distribution *a posteriori* d'un paramètre θ . Une fois cette distribution obtenue, elle peut être comparée avec les valeurs observées en remplaçant l'estimation de la vraisemblance des méthodes bayésiennes, par une approximation via l'utilisation de statistiques résumées.

Une analyse ABC peut être divisée en 9 étapes (Bertorelle *et al.* 2010):

Etape 1 : Définition des scénarios. Il s'agit de définir des modèles d'introduction et de renseigner les données historiques et démographiques relatives à l'invasion. Lors de l'écriture du scénario, les événements (divergence, mélange de populations, changement de taille efficace des populations considérées) sont fournis de façon séquentielle en remontant le temps depuis le présent. Le temps est mesuré en générations et la taille efficace des populations et le taux de mélange (si c'est le cas) sont renseignés à chaque événement de divergence, de changement de taille ou de mélange.

Etape 2 : Définition des *priors*. Il s'agit d'associer des valeurs, des intervalles de valeurs, ou des distributions *a priori* à chacun des paramètres génétiques (modèle de mutation, taux de mutation *etc.*), démographiques (taille efficace des populations, taille des populations lors de goulots d'étranglement) et historiques (date de première observation de la population envahissante, date de divergence entre populations, date de mélange de populations *etc.*).

Etape 3 : Choix des statistiques résumées. Il s'agit de choisir les statistiques nécessaires à la description des variations génétiques intra et inter-populations (nombre moyenne d'allèles par locus, hétérozygotie moyenne attendue, F_{st} , distance des allèles partagés (DAS), *etc.*)

Etape 4 : Simulation des données génétiques. Il s'agit de simuler les données génétiques à partir des lois *a priori* définies dans chaque scénario aux étapes 1 et 2.

Etape 5 : Rejet des jeux de données les moins informatifs. Dans cette étape chacun des jeux de données simulées est résumé à l'aide des statistiques précédemment choisies. Pour ce faire, les distances euclidiennes entre les statistiques simulées et celles observées sont calculées. Ensuite, les données simulées trop éloignées des données observées sont rejetées par rapport à un seuil de rejet choisi.

Etape 6 : Sélection du scénario le plus probable. Cette étape consiste dans le calcul de la probabilité *a posteriori* de chaque scénario par une régression logistique sur les jeux de données conservées à l'étape 5.

Etape 7 : Evaluation de la confiance dans le choix du scénario. Il s'agit de calculer les erreurs de type I et II. L'erreur de type I est la probabilité d'exclure le scénario

sélectionné dans l'étape 6, alors qu'il est vrai. L'*erreur de type II* est la probabilité de choisir un scénario, alors qu'il est faux.

Etape 8 : Estimation des paramètres. Cette étape consiste à établir la distribution *a posteriori* des paramètres par une analyse de régression locale des paramètres par rapport aux statistiques résumées.

Etape 9 : Evaluation de la confiance dans l'estimation des paramètres. Il s'agit d'estimer la confiance qu'on peut avoir dans les résultats en mesurant le *biais relatif moyen* (différence moyenne entre valeur estimée et valeur vraie, divisée par la valeur vraie), l'*erreur moyenne relative* (racine carrée du carré moyen de l'erreur, divisée par la vraie valeur), l'*intervalle de confiance à 50% et 95%* (l'intervalle de données simulées qui ont respectivement 50% et 95% de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé) et le *facteur 2* (pourcentage de fois où la vraie valeur est comprise entre la moitié et le double de la valeur estimée).

Concernant les valeurs vraies, deux options sont possibles : elles peuvent être définies par l'expérimentateur ou écrites à partir des distributions.

VI.4. RESULTATS DE L'ANALYSE GENETIQUE DES POPULATIONS DE *V. VELUTINA*

La caractérisation génétique des populations invasives et des populations de la zone d'origine de *V. velutina* a permis de reconstruire l'histoire de l'introduction du frelon à pattes jaunes et d'identifier des facteurs biologiques susceptibles d'expliquer le succès de son invasion.

Pour identifier les sources probables de populations introduites et décrire avec précision l'histoire de l'invasion en France, l'ensemble des populations, natives et invasives, a été caractérisée pour la diversité au gène mitochondrial COI et aux 22 loci microsatellites. Les données moléculaires ont été analysées par des approches classiques de la génétique des populations et par la méthode ABC, à l'aide du logiciel DIYABC (Cornuet *et al.* 2010).

Les résultats de ces analyses montrent que *V. velutina* a connu un important goulot d'étranglement au cours de son introduction qui a significativement réduit sa diversité

génétique. En combinant les données moléculaires aux données historiques de démographie de l'espèce, ces analyses nous ont permis de démontrer que les deux populations invasives, France et Corée, provenaient de deux événements d'introduction indépendants depuis l'Asie. Par ailleurs, la population source la plus probable est la même pour les deux invasions : elle a été identifiée dans une zone géographique comprise entre les provinces chinoises du Zhejiang et du Jiangsu. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une importation du frelon via les échanges commerciaux entre ces différentes régions.

Par ailleurs, l'estimation de l'effectif efficace de la population introduite suggère que la population française résulterait de l'introduction d'une seule femelle, fécondée par plusieurs mâles. La date de première introduction a été estimée entre le 2001 et le 2004. L'apparente perte de diversité génétique chez *V. velutina* lors de son introduction en France n'a visiblement pas contraint le succès de son invasion : le frelon à pattes jaunes, depuis son introduction, a connu une expansion très rapide en Europe.

Afin de comprendre quels sont les mécanismes biologiques explicatifs de ce succès d'invasion nous avons entrepris une caractérisation génétique des colonies de la lignée envahissante. La constatation que plusieurs lignées paternelles étaient présentes dans la population de *V. velutina* établie en France, nous a permis de suggérer que la polyandrie pourrait avoir significativement contribué au succès de l'invasion. Ce système, qui est presque unique parmi les Vespidae, aurait offert une flexibilité génétique et aurait apporté une importante contribution lors de l'introduction en permettant à l'espèce de passer les barrières écologiques et reproductives associées au processus invasif.

L'ensemble des résultats sont présentés dans l'**article 2**, qui sera très prochainement soumis à *Molecular Ecology* et seront intégrés dans la discussion générale.

ARTICLE 2: A SINGLE MULTI-MATED FEMALE IS RESPONSIBLE FOR THE YELLOW-LEGGED HORNET *VESPA VELUTINA* INVASION IN EUROPE

Arca, M.^{1,2} ; Mougél, F. ² ; Guillemaud, T.³ ; Dupas, S.¹ ; Rome, Q.⁴ ; Perrard, A.⁴ ; Muller, F.⁴ ; Fossoud, A.¹ ; Capdevielle-Dulac, C. ¹ ; Torres-Leguizamon, M.¹ ; Chen, X.X.⁵ ; Tan J.L.⁶ ; Jung C.⁷ ; Villemant, C.⁴ ; Arnold, G.² ; Silvain, J.-F.¹

¹ *Unité de Recherche IRD 072, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 91198 – Gif-sur-Yvette cedex, France and Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay cedex, France*

² *CNRS, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 91198 – Gif-sur-Yvette cedex, France and Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay cedex, France*

³ *INRA, UMR 1301 IBSV (INRA / Université de Nice Sophia Antipolis / CNRS). 400 Route des Chappes. BP 167 - 06903 Sophia Antipolis cedex.*

⁴ *Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR7205, CP50, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France.*

⁵ *State Key Laboratory of Rice Biology and Ministry of Agriculture Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029. China*

⁶ *School of Life Sciences, Northwest University 229 Taibai North Road, Xi'an, Shaanxi, 710069, China*

⁷ *School of Bioresource Sciences. Andong National University, Andong 760-749 Korea*

Keywords: Yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina*, invasive species, microsatellites, approximate Bayesian computation.

Corresponding author: Mariangela Arca, Laboratoire Evolution, Génome et Spéciation, bâtiment 13, Campus CNRS Avenue de la Terrasse 91190 Gif-sur-Yvette, France, fax number : 0033 1 69 82 37 36, mariangela.arca@legs.cnrs-gif.fr

Abstract

The Yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, was accidentally introduced from south-east Asia into France and Korea and has invaded these two distant countries over the last ten years. Since its introduction, it has rapidly become an economic problem and caused serious honeybee colony losses due to its severe predation. To identify likely sources of introduced populations and accurately describe the history of the invasions, we examined the relationships among native *V. velutina* populations from China, Indonesia and Vietnam and introduced populations from France and Korea. Populations were characterized using cytochrome C oxidase (COI) sequence data and nuclear microsatellite allele frequencies. Molecular data was analyzed using classic population genetics tools and approximate Bayesian computation (ABC) approaches.

We demonstrated that the populations in France and Korea originated from two independent introduction events, but that the most probable source population is the same for both invasions: identified as coming from an area between the Chinese provinces of Zhejiang and Jiangsu. These findings confirm the hypothesis of an importation via commercial exchanges between these geographic regions.

In Europe, introduced Chinese Yellow-legged hornets spread rapidly despite a substantial loss of genetic variation. Our results suggest that a single queen was responsible for the invasion. The success of this dramatic founder effect was made possible by the polyandry of *Vespa velutina*, which is almost unique among Vespidae. This particular reproductive system provides genetic flexibility and might have enhanced the success of *V. velutina* as an invasive species, as demonstrated by the concomitant invasion of France and Korea.

Introduction

Expansion of global trade, and increases in human mobility over the last century has resulted in unprecedented invasions by non-native species. These biological invasions produce severe, often irreversible impacts on agriculture and natural resources (Mack *et al.* 2000; Beggs 2001; Matthews *et al.* 2001; Holway *et al.* 2002; Pascal & Lorvelec 2005). Among the most documented biological groups, social insects were defined as very successful invaders (Moller 1996). Many social insect species have become established outside their native ranges, and a subset of them is among the world's worst invasive species (IUCN, 2000; Lowe *et al.* 2001, Global Invasive Species Database (<http://www.issg.org/database>)).

Generally, the invasive success of social insects has been attributed to some of their life-history traits that facilitate their introduction and demographic success into new habitats (Mack *et al.* 2000; Beggs 2001; Matthews *et al.* 2001; Holway *et al.* 2002; Pascal & Lorvelec 2005; Inoue & Endo 2008).

Behavioral flexibility permitted by the sociality may explain the invasive success of some social species. Introductions of ants, that are among the most widespread and damaging alien species, are often accompanied by genetic changes that lead to alterations in social behavior and colony structure contributing to their success (Moller 1996; Aron 2001; Tsutsui *et al.* 2001; Giraud *et al.* 2002; Fournier *et al.* 2009).

Another key to the success of social insects as invasive species is the ability of a single queen to found a populous colony and to produce a large number of reproductive females that provide large dispersal capacity (Moller, 1996; Davidson, 1998; Chapman & Bourke, 2001; Holway *et al.* 2002; Paini & Roberts, 2005). This is the case of the *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) invasion of New Caledonia and Hawaii: the unusual, largely clonal, reproductive strategy of the little fire ant enhanced its success as an invasive species (Foucaud *et al.* 2006; Mikheyev *et al.* 2009). According to Schmid-Hempel *et al.* (2007) it is also the case for *Bombus terrestris* (L., 1758).

Specific association with human activities is another feature that makes social insects successful invaders. This association is particularly relevant for Bees (*Bombus* and *Apis* spp.). For economic reasons these social insects have been deliberately introduced to

new areas (Moller 1996; Ings *et al.* 2005). *Bombus* spp. are widely used as agricultural pollinators in many countries to enhance the pollination of commercially important crops (Banda & Paxton, 1991). In Japan, Chile, Tasmania, Israel and New Zealand, *B. terrestris* has become naturalized, and may threaten native ecosystems (Buttermore 1997; Nagamitsu & Yamagishi 2009). In this case, repeated introductions or the introduction of a large number of individuals could have significantly contributed to the invasive success. Similarly, large scale introductions have been carried out in the case of honey bees *Apis mellifera* L. 1758, for honey production. One example is the invasion in the Americas of the Africanized honey bee, a hybrid generated by a man-made breeding of the African honey bee, *A. m. scutellata* Lepeletier, 1836, with various European honey bees (Chapman & Bourke 2001). Africanized bee is now the dominant bee species in most tropical and subtropical areas in the American continent (Roubik *et al.* 1989; Smith 1991; Winston 1992; Chapman & Bourke 2001). Life-history traits of this hybrid bee favoring its invasion includes a high rate of colony reproduction by swarming, high aggression towards intruders, high mobility of colonies and low specialized nesting requirements compared to their European parent races (Roubik 1989; Winston 1992).

Among social hymenopteran, *Vespa* species are not commonly considered as invaders. Several species have been introduced beyond their native range, but most of them failed to establish (Carpenter & Kojima 1997; Dvorak 2006; Beggs *et al.* 2011; Villemant *et al.* 2011). Nevertheless, in an attempt to control forest caterpillar outbreaks, *Vespa crabro* L., 1758 has been intentionally released in the USA in the nineteenth century (Shaw & Weidhaas, 1956) and the species is now naturalized across eastern United States and Canada (Carpenter & Kojima, 1997). However, this species does not seem to cause any particular damage (Beggs *et al.* 2011).

Another invasion among Vespidae, noteworthy for its rapidity and visibility, is the recent introduction and establishment of *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, the Yellow-legged hornet to France and Korea. It is the first successful invasion of an exotic Vespidae into Europe (Haxaire *et al.* 2006; Villemant *et al.* 2006; Rasplus *et al.* 2010; Villemant *et al.* 2011). *V. velutina* naturally occurs in Asia, from Afghanistan to eastern China, Indo-China and Indonesia (Carpenter & Kojima, 1997), where it is known as an active predator of honey bees (Abrol, 1994; Tan *et al.* 2007). The first field record of the

Yellow-legged hornet was obtained in Lot-et-Garonne département in 2005, where, according to locally collected data it was likely present as early as 2004 (Haxaire *et al.* 2006). Since its introduction, the hornet has spread rapidly across south-west of France (Villemant *et al.* 2006; Rome *et al.* 2009). The invaded area reached about 190,000 km² in 2010 (Villemant *et al.* 2011 and fig. 1). The hornet was also very recently reported in the northern regions of Spain (Basque Country and Navarre) (Castro & Pagola-Carte 2010; López *et al.* 2011), several *V. velutina* were captured at Viana do Castelo in Portugal (M. Maia, personal comm.) and a male was identified at Flobecq in Belgium (J. D'Haeseleer, personal comm.).

It has been suggested that the first introduction of the Yellow-legged Asian hornet in France was related to an event of importation of horticultural pots from China (Villemant *et al.* 2006). The first hornet observation was made by a French bonsai producer near his property. This producer regularly imports pots from Chinese coastal areas close to Shanghai (Villemant *et al.* 2011). The invasive propagules thus may have been dissimulated in pots carried on cargo boat from these Chinese provinces. Following this hypothesis they presumably did not constitute a full nest too large and aggressive to remain undetected during the transportation, but one or few newly mated queen(s).

Little is known about *V. velutina* introduction in Korea. It has been found for the first time in Bongrae Mountain, Yeong-do districts, near Busan, from 2003. In this country *V. velutina* appeared to have spread much more slowly (Jung *et al.* 2008; Choi *et al.* 2011) than in France (Rome *et al.* 2009; Villemant *et al.* 2011). In Korea, indeed, the invasive hornet has to compete with six *Vespa* species versus only one, *V. crabro*, in France (Villemant *et al.* 2011). The distribution of this species seemed in a first stage limited to north-eastern Busan area, but is now expanding (Kim *et al.* 2006; Jung *et al.* 2008; Choi *et al.* 2011).

Like many other invasive species, *V. velutina* has never caused significant economic problems in its native range, where many environmental factors (i.e. predation and competition) are likely to limit its population levels. In the French area of introduction, these factors are to our knowledge lacking. Its multiplication is also greatly enhanced by the presence in large numbers over the entire surface of the European territory of one of its favorite food: the European honey bee *Apis mellifera* (Perrard 2009, Arca *et al.*

unpubl. data). The latter is the hornet's main prey likely because, contrary to the Asian species *Apis cerana* F., 1793 (Villemant 2008, Ken *et al.* 2005), it has no effective defensive behavior to fight against this new predator (Rortais *et al.* 2010; Arca *et al.* unpubl. data). Yellow-legged hornet that feeds on a diversity of insects can also have a significant impact on the native arthropod biota. However, if its impact on insect diversity is difficult to assess, the damages on the French apiaries are evident: the high losses due to deaths of colonies and to reduction of honey production led some beekeepers to abandon their business (Villemant *et al.* 2011). In addition to damages on apiaries, *V. velutina* appears frightening and potentially dangerous to human populations due to its huge nest and population size. Several casualties have been attributed to the Yellow-legged hornet in France and have been documented by national and regional media.

The objective of this study is to genetically trace the history of the introduction of *V. velutina* in France in order to *i)* determine the number of independent introduction events, *ii)* identify the geographic origin of the introduced propagules, *iii)* estimate the number of founders responsible for the establishment of the invasive population and *iv)* improve the knowledge about *V. velutina* life traits that may have facilitated its demographic success in the invaded areas. Such information about sources and propagule pressure (i.e. the number of individuals introduced and/or the number of introductions performed) is essential to understand whether there is a relationship between genetic diversity and invasion success. Furthermore, knowledge of invasion routes is a key step to decipher the factors responsible for the invasive success (Estoup & Guillemaud 2010).

Genetic study of the invasion history was addressed with both mtDNA and recently generated microsatellites. Data obtained from these molecular markers were analyzed with various methods including phylogeny reconstruction, clustering of individuals, assignation of individuals to populations and approximate Bayesian computation (ABC) approaches. These tools showed congruent results and allowed us to identify the geographic origin of invaders, to delineate the scenario of invasion and specify the number of founders.

Material and methods

Sample collection and DNA isolation

Samples of *V. velutina* have been obtained from six geographical areas: France, Korea (invaded areas), Vietnam, Indonesia, Yunnan and Zhejiang/Jiangsu provinces (native areas) (Fig. 1). Females were collected in front of beehives, in front of hornet nest or with trapping methods used in beekeeping. Sampling locations and sample sizes are indicated in Figure 1.

In addition to the hornets collected in the field, we analyzed samples of *V. velutina* from 10 different colonies from three French districts: Dordogne, Gironde and Ile-de-France. A total of 460 DNA female nymphs were genotyped. DNA was extracted from nymphs or adults (thorax or legs) using the 'DNeasy tissue Kit' (Qiagen).

Mitochondrial DNA sequencing and analysis

Forty-eight individuals of *V. velutina* from France and 48 from Asia (Indonesia, Vietnam, China, Korea) were amplified with universal primer sequences HCO 2198 and LCO 1490 to yield a 658 bp fragment of the mitochondrial gene cytochrome C oxydase subunit I (COI) (Folmer *et al.* 1994).

Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifications were performed according to the standard PCR reaction protocol used in Canadian Centre for DNA Barcoding (Hajibabaei *et al.* 2005). PCR products were checked on a 2% agarose gel. Purified PCR fragments obtained from the HCO / LCO primer pair were sequenced in both directions. Both strands of DNA were aligned manually using BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall 1999). No insertions, deletions or stop codons were present in the alignment. Edited sequences of each haplotype were deposited in GenBank (accession numbers: ... – ...). Genetic differences among haplotypes were graphically represented by a maximum parsimony tree using MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007). Haplotype and nucleotide diversity (Nei 1987) were calculated using DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.* 2003).

Microsatellite amplification and analysis

Seven microsatellite loci previously developed for other Vespidae, VMA-6 and VMA-8 for *Vespa mandarinia* (Hasegawa & Takahashi 2002), LIST2003, LIST2015 and LIST2004B LIST2018B, LIST2020B for eusocial wasps (Daly *et al.* 2002), were used for *V. velutina*.

The letter 'B' after the primer name indicates that primers were redesigned from the loci isolated by Daly *et al.* 2002 (see Supporting information for their sequences). Fifteen additional loci isolated from *V. velutina* were used in the present study (Arca *et al.* 2011). All hornets were genotyped at twenty-two microsatellite loci listed in Table S1, Supporting Information.

PCR amplifications were performed following the protocol described in Arca *et al.* 2011. PCR products were analyzed in DNA capillary sequencer ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Alleles were scored with GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems), and each allele-call was manually checked.

Because of low-quality template DNA, we could not obtain complete genotypes for 28 Chinese and 14 Indonesian specimens. However, because these specimens failed at only five loci at most, we included them in all analyses.

Number of alleles, allele frequencies and exact tests of Hardy–Weinberg equilibrium were calculated in ARLEQUIN 3.01 software package (Excoffier *et al.* 2005). Effective number of alleles and Nei's diversity index has been calculated using GenAlex program, version 6 (Peakall & Smouse 2006).

Population structure

Genetic relationships among populations were examined in several ways. We built Neighbor Joining (NJ) trees of individuals using shared allele distances (DAS; Chakraborty & Jin 1993) as implemented in Populations 1.2.30 (Langella 2007). NJ trees were visualized with TreeView (release 1.6.6; Page 1996). Population structure was also analyzed using Bayesian clustering techniques with the software STRUCTURE 2.0 (Pritchard *et al.* 2000). According to Falush *et al.* 2003 STRUCTURE analysis was performed considering both the admixture model and the correlated allele frequencies between populations. The length of the burn-in and MCMC (Monte Carlo Markov chain) were 10 000 and 100 000, respectively. The number of clusters (K) was set from 2 to 20. For the whole data set (171 hornets distributed in 6 populations) 10 runs were carried out for each value of K . French population was further studied with STRUCTURE in order to determine the number of clusters and explore their geographic distribution.

Genetic differentiation between populations was estimated using F_{st} calculated in ARLEQUIN ver. 3.01 (Excoffier *et al.* 2005) and tested with 10 000 random permutations of genotypes.

Assignment test

The program GeneClass 2.0 (Piry *et al.* 2004) was used to assign or exclude reference populations (Indonesia, Vietnam, Yunnan and Zhejiang/Jiangsu) as possible origins of individuals from France and Korea, on the basis of multilocus genotypes. The program calculates, for each individual of a population, the probability of belonging to each other reference population. We used the standard criterion described by Rannala & Mountain (1997), which applies Bayesian statistics to compute assignment probabilities. The Monte Carlo resampling method (Paetkau *et al.* 2004) was also applied to identify the accurate exclusion/inclusion critical values: our results were based on 10 000 simulated genotypes for each population and on a threshold probability value of 0.01.

Bottleneck test

We investigated the occurrence of recent genetic bottlenecks in French population using a test of heterozygosity excess implemented in Bottleneck 1.2.0.2 (Cornuet & Luikart 1996; Piry *et al.* 1999). Heterozygosity excess is expected in populations that have experienced a significant reduction in size because rare alleles are lost (Cornuet & Luikart 1996). Two mutation models were tested: infinite allele model (IAM) and two-phase model (TPM), which incorporates elements of the IAM and stepwise mutation model (SMM) model (variance = 12, SMM = 95%, Piry *et al.* 1999). The Wilcoxon's sign-rank test were used for assessing statistical significant bottleneck because of its high statistical power (Luikart & Cornuet, 1998) as it can be used for as few as four polymorphic loci and any number of individuals (15–40 individuals and 10–15 polymorphic loci is recommended to achieve high power). This condition is easily fulfilled with 22 loci and 83 individuals analyzed in French populations.

As an alternate approach to detect recent genetic bottlenecks, we used the method described in Luikart *et al.* (1998). Bottlenecks should cause a decrease in rare alleles and a resultant shift in the mode of the allele frequency histogram.

Mating statistics

For this study 12 microsatellite loci were used: List2003; D3-15; R3-115; R4-114; D2-185; R4-100; R1-158; R1-137; R1-36; R1-75; R1-77; R1-80. Queen and mate genotypes were inferred from the worker offspring data using MateSoft 1.0 (Moilanen *et al.* 2004). When available, haploid males were also genotyped to confirm queen alleles. The broad deduction option offered by the program was employed to take into account the multiple mates. If multiple alternative queens were possible, only the one requiring the smallest number of patriline to explain the worker genotype array was considered.

Inferring invasion scenarios using approximate Bayesian computation

To explore putative scenarios of invasion followed by Yellow-legged hornet in France and Korea, an approximate Bayesian computation (ABC) analysis was performed on microsatellite data. DIYABC version 1.0.4.46 (available at <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/diyabc> (Cornuet *et al.* 2008)) was used. ABC is a statistical method computing posterior probabilities of competing scenarios. Briefly, 10⁶ datasets are simulated according to each competing scenarios with parameters drawn from prior distributions. Observed and simulated datasets are then summarized using summary statistics. Normalized Euclidian distances between observed and simulated sets of summary statistics are then computed, and the 10 000 smallest distances are used to estimate the posterior probabilities of the competing scenarios using a weighted polychotomous logistic regression (Beaumont *et al.* 2002; Cornuet *et al.* 2008).

For each invasive population (France and Korea) (Pinv), four possible sampled source populations were considered: population P1, sampled from Zhejiang and Jiangsu provinces; population P2, sampled in the Yunnan province; population P3, sampled from Vietnam; and population P4, sampled from Indonesia. Because these samples may represent only a subset of the genetic variability of the native area we considered the possibility that the real source of both invasive populations was actually not sampled. In this context and following the procedure described by Lombaert *et al.* (2011), we considered that the true source population could be among four unsampled populations (named Pf_j ($j = 1...4$)) that diverged from the four sampled native populations tf generations before sampling (Fig. 2a). In addition, we also considered the possibility

that the actual source of the introduced populations was unsampled and genetically distant from the 4 sampled native populations. We thus considered the possibility that the source of the introduced hornets (Pg) diverged directly from an ancestral population at about the same time as did the other 4 sampled native populations (Fig. 2b). Finally we considered admixture scenarios in which introduced hornets derived by admixture from two of the five source populations described above (P1-P4 and Pg) (Fig. 2c). This resulted in the comparison of 15 scenarios in DIYABC analysis for each invasive population, France and Korea (Table 4). We assumed that, after divergence, populations did not exchange migrants.

We chose prior parameter distributions according to historical and biological knowledge on *V. velutina*. As proposed by Bertorelle *et al.* (2010) we also made several successive runs of simulation to choose divergence time and effective population size prior distributions grossly compatible with observed pairwise F_{st} and allelic richness. Effective population sizes of sampled ($N1, N2, N3, N4$) and unsampled (Nf and Ng) source and of invasive populations (Ns) were drawn from Log-Uniform distribution bounded by 200 and 20000 (LogUnif[200-20000]) diploid individuals. The divergence time tf between the hypothetical source populations and the sampled native populations was drawn from a uniform distribution comprised between 30 and 500 generations. Historical data suggest that introductions in France and Korea arose before 2005. Because of the difficulty to detect introduced insects when at low density and uncertainty about the real introduction date ti , it was drawn between 10 and 20 generations (Unif[10-20]). After their introduction each invasive population size Nb was drawn from LogUnif[2-1000], with $Nb < Ns$, during tb generations (Unif[1-5]). Parameter tb bounds between 1 and 5 generations because historical data suggest that invasions in France and Korea arose before 2005 and sampling was conducted between 2007 and 2010. Finally all five native populations (including the unsampled one) diverged from an ancestral native population tj ($j = 1...5$) generations ago (Unif[100-500]). We considered a generation time of 1 year because this hornet species has an annual life cycle (Matsuura & Yamane, 1990).

The summary of statistics calculated from the simulated and observed data for each of the fifteen tested scenarios were those classically used in ABC (Cornuet *et al.* 2008;

Guillemaud *et al.* 2010; Lombaert *et al.* 2010). For each population we used the mean number of alleles per locus, the mean expected heterozygosity (Nei, 1987), the mean allelic size variance and the mean ratio of the number of alleles over the range of allele sizes (Garza & Williamson, 2001). For each pair of sample we used the pairwise F_{st} values (Weir & Cockerham, 1984). For each pair of sample including the invasive population under analysis we used the shared alleles distance (DAS) (Chakraborty & Jin, 1993), the Goldstein distance (μ^2) (Golstein *et al.* 1995), the mean individual assignment likelihoods of population i being assigned to population j , and the maximum likelihood estimate of admixture proportion (Pascual *et al.* 2007).

Regarding parameters for microsatellite marker, each locus was assumed to follow a generalized stepwise mutation model (GSM) with a possible range of 40 contiguous allelic states for all loci, except for locus R1-180 for which allele range is 80. The mean mutation rate (μ) was drawn in a uniform distribution bounded between 10^{-4} and 10^{-3} and the mutation rate for each locus was drawn independently from a Gamma distribution (mean= μ and shape=2). The mean parameter of the geometric distribution (p) of the length in repeat number of mutation events was drawn in a uniform distribution bounded between 0.1 and 0.3. The mean single nucleotide insertion/deletion mutation rate (μ_{SNI}) was drawn from uniform distribution bounded by 10^{-8} and 10^{-4} and the individual locus rate was drawn from a Gamma distribution (mean = μ_{SNI} and shape = 2).

Using parameter values drawn in the prior set, we produced 1,000,000 simulated data sets for each scenario. The normalized Euclidian distance between the observed and simulated sets of summary statistics was then computed, and the 10000 closest simulated data sets (1%) were selected to estimate the posterior distribution of the parameter using a local linear regression technique (Beaumont *et al.* 2002). To compute type I and II errors, we simulated 100 pseudo-observed data sets (PODS) under each scenario. These PODS which correspond to simulated data for which the true scenario is known were treated by ABC as if they were observed data. In that case and for reason of tractability we used 100,000 data sets only for each scenario during the ABC procedure.

In case the same scenario was selected for both France and Korea, e.g. they both originated from unsampled sources deriving from the same sampled population X, we

performed an additional analysis to establish whether France and Korea could be the source of each other. In this additional analysis we compared scenarios in which Korea and France i) could independently originate from the same unsampled source that derived from sample population X, ii) could originate from 2 unsampled populations that derived from the same sampled population X, or iii) could derive from each other (France from Korea and Korea from France) and iv) could ultimately derive from sampled population X. This analysis resulted in the comparison of 4 different scenarios.

Test of the sexual admixture model using DIYABC

The biology of the species suggests that the invasive populations may derive from a few females and a large number of males. In other words, they may derive from a mixture between one female bottlenecked population (P_{fm}) and one male less bottlenecked population (P_m). We used the software DIYABC (Cornuet *et al.* 2008) to test this particular admixture model and estimate the effective population size for the French invasive population and for the source population (obtained from the ABC analysis described above). We considered 2 scenarios. Scenario A corresponds to the introduction in France of one bottlenecked population (the introduced female(s) P_s). In Scenario B, the French invasive population (P_{inv}) derived by admixture between two populations (founders' diploid females (P_{fm}) and their mating haploid males (P_m) with different sizes (N_{fm} and N_m respectively) and immediately admixed.

In both scenarios, the invasive population P_{inv} diverged at a time $t1$ from the source P_s. For the source the effective population size is set to N_s. In scenario A, we assumed the occurrence of a bottleneck during the introduction to France at $t1$ generations in the past. In scenario B, the immediate sources of the French population were assumed to be two unsampled subpopulations P_{fm} and P_m corresponding to diploid females and their fertilizing haploid males founders respectively. Both male and female subpopulations derived from the same ancestral population P_s and were mixed after a single generation to generate the introduced population P_{inv}, characterized by an effective size N_{inv}. The admixture rate was $r_{fm}=2/3$ and $r_m=1/3$ for females and males respectively. The admixture rates reflect the composition of the following generations where haploid males will receive only maternal alleles while the diploid females will receive maternal

and paternal alleles. Therefore, two thirds of the alleles are expected to be of maternal origin and one third of paternal one.

Demographic parameter priors and summary statistics were the same than those used for the previous DIYABC analysis. For both scenarios, we imposed the supplementary conditions, $N_{inv} < N_s$ and $N_{fm} \leq N_m < N_{inv} < N_s$ respectively. 1,000,000 datasets were simulated per scenarios and compared to observed data. Posterior probabilities of two scenarios were estimated for each simulated data set and used to compute type I and II errors in the selection of scenarios.

Normalized Euclidian distances between observed and simulated sets of summary statistics were then computed, and the 10,000 closest simulated data sets (1%) were used to estimate the posterior parameter distributions using a local linear regression (Beaumont *et al.* 2002). For each parameter, the mode of the distribution was used as an estimate. The performance of parameter estimations was then assessed by generating 1000 test data sets.

Results

Mitochondrial DNA analysis

Mitochondrial haplotypes were characterized in 4 native regions (Zhejiang/Jiangsu, Yunnan, Vietnam and Indonesia) and 2 invaded regions (Korea and France), as well as in closely related species (*Vespa bicolor* F., 1787) as outgroup. The alignment yielded a 658 bp fragment with 120 (18.24%) variable sites, among which 42 were parsimony informative. Eleven COI haplotypes were detected from a total of 96 *V. velutina* individuals sampled in native and invaded regions (Fig. 1). All 11 haplotypes were found in the native area (3 from Zhejiang/Jiangsu eastern China provinces (F, K and Z), 3 from Yunnan south-western Chinese province (Y, U and A), 2 from Vietnam (V and T) and 3 from Indonesia (I, N, D)) and only two of them were also found in the introduced areas making haplotype diversity significantly higher in the native range. Furthermore, each native population showed at least two haplotypes with haplotype diversity ranging from 0.216 to 1, and nucleotide gene diversity ranging from 0.001 to 0.038 while both indices are 0 in the population samples from introduced areas. No sequence variation was observed between individuals from an invaded region (France and Korea). All sequences conformed to a single haplotype in each region: the haplotype F in France and the haplotype K in Korea.

Both haplotypes were also found in the native population of Zhejiang/Jiangsu (near Shanghai) but not in the other sampled regions (Yunnan, Vietnam and Indonesia) suggesting a possible origin of the invasive populations in Zhejiang/Jiangsu region.

Phylogenetic analysis of the haplotypes yielded four most-parsimonious trees, one of which is presented in Fig. 3. All four trees have almost similar topology, differing only in the placement of haplotype U. The haplotypes identified display a clear geographical pattern. The most basal haplotypes are those from Vietnam (T, V) and Indonesia (I, N, D). Chinese and invasive haplotypes are located at the top of the tree. The haplotype F is closely linked to the haplotypes found in Yunnan region (Y, A, and U) and to the other haplotypes found in the eastern provinces of China near Shanghai: Jiangsu and Zhejiang (haplotypes Z and K).

Microsatellite Diversity

All 22 microsatellite loci analyzed in this study were polymorphic in at least one population (Table S1, Supporting information). In France, only one locus was monomorphic (D2-142) (Table 2).

No linkage disequilibrium was observed for any pair of loci after correction for multiple testing. Therefore, further analyses were performed on multi-locus data from all twenty-two microsatellites. Two regions (Korea and eastern China) showed no departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) at all their loci. In the four other populations, significant deviations were observed at least at one locus analyzed. However, as the departure was not systematically observed over all the loci in one population or over all the population at one locus, the most likely hypothesis is the presence of population specific null alleles (Table 2).

The mean number of alleles detected per locus and per population varies from 2.727 in Korea to 7.273 in Yunnan (Table S1, Supporting information). Apart from Vietnam, genetic diversity was significantly higher in native range than in introduced regions, for several indices: mean number of alleles per locus, allelic richness, expected heterozygosity and Nei's diversity index (Fig. 4). The outlier point is Vietnam, an Asian country considered as part of *V. velutina* native range, which shows relatively lower genetic diversity compared to other native populations (Fig. 4).

Bottleneck detection

To detect recent bottleneck (heterozygosity excess) in the French invasive populations the infinite allele model (IAM) and two-phase mutation model (TPM) were used in Wilcoxon's signed rank test on heterozygosity (BOTTLENECK). Korea invasive population was excluded from analyses conducted in BOTTLENECK due to small sample sizes. Consistent with a bottleneck, the heterozygosity excess was significant ($P < 0.05$) under both IAM and TPM. These results are in agreement with the decrease of genetic diversity observed with mean number of alleles and Nei's diversity index.

The distribution of allele frequencies in French invasive population was not exactly what is expected after a bottleneck event (Fig. 5). Native and stable populations are characterized by a L-shaped distribution, thus, showing numerous alleles with low

frequencies. Invasive bottlenecked populations are supposed to show a mode-shift to more alleles at intermediate frequencies resulting from the elimination of rare alleles in founder effect. However, the allelic distribution analysis in French and Korean populations revealed a skewed distribution but with a bimodal tendency and a “wave” at low allele frequencies. Among the native populations, Vietnam is still an exception: the histogram of allele frequencies has the same bimodal distribution as observed in invasive populations.

Populations structure and relationships

There was considerable divergence among populations: pairwise F_{st} range from 0.078 to 0.365 and all values were significantly different from zero (Table 3). Generally, F_{st} were high between native and invasive populations (except between Korea and Zhejiang/Jiangsu) and always slightly higher between France and native populations than between Korea and native populations. For both invasive populations, the lowest F_{st} estimates was with Zhejiang/Jiangsu population.

Figure 6 shows the neighbor-joining tree of individuals based on microsatellite data. There is evidence of geographical structure. Individuals from the same geographic population generally grouped together at the exception of few individuals (marked with an asterisk in Figure 6). The French individuals of *V. velutina* are clearly separated from those from Asia. Zhejiang/Jiangsu being the closest cluster to the French one. In contrast, Korean individuals are grouped in a cluster included in the Zhejiang/Jiangsu population. There were three principal clusters for the remaining samples: one from Yunnan, one from Vietnam and one from Indonesia. All three clusters were more closely related to Zhejiang/Jiangsu population than to French population.

Bayesian cluster analysis was performed with STRUCTURE without prior information on the geographic origin of samples. Progressive partitioning was visualized comparing the plots obtained for each value of K varying from 1 to 20. The pattern of clustering is shown in Figure 7 with hierarchical presentation of successive subdivisions obtained when increasing K from 2 to 13. French invasive population is the first to separate from the native provenances. Indonesian population is also individualized very early (from K=3) and in a stable manner. Vietnam separates definitively from the other populations

at K=7. Geographical structure progressively emerges in the other Asian populations when K increases with the individualization of four sub-regions from Yunnan for K=9. These sub-regions correspond to four different sampled localities situated in Kunming, Chuxiong, Dali and Honghe prefectures. On the opposite, the Korean invasive population clustered always with native populations from K=2 to K=13, excepted for K=10 and K=11, in which Korea individuals clustered apart.

When considering only the French individuals, STRUCTURE was able to detect a genetic structure among the French population. However, the 6 recovered groups are not geographically structured and the F_{st} values between them are low (Table S2, Supporting information).

GENECLASS was used to statistically test putative assignment of invasive individuals to native populations of *V. velutina* (Table 3). Invasive *V. velutina* sampled in France and in Korea are mostly assigned to the eastern Chinese province of Zhejiang/Jiangsu. Individuals from these two invasive populations were rarely or never assigned to Indonesia, Vietnam and Yunnan populations.

Genetic composition of colonies

Genotypes of worker offspring and of haploid males were determined on the basis of the polymorphism of up to 12 microsatellite loci for 9 colonies from France.

All sampled colonies had worker offspring from a single queen (Table 4). The putative queen genotypes were inferred with Matesoft. The power to correctly deduce the queen genotype was larger than 0.95 for all 9 offspring groups. When different putative queen genotypes are proposed, the genotypes of the haploid sons allowed excluding the queen genotypes that were not consistent. The queen genotype was unambiguously assigned for five analyzed colonies. Uncertainty of the queen genotype remained for colonies V0809, V0912, V0926 and V0921 due to the lack of haploid sons. For these nests, the genotype of queen that requires the minimum number of mates was retained according to parsimony principle (Table 4).

The mean number of mating observed per queen was 4.7 ± 2.5 . The majority (67%) of the 9 *V. velutina* colonies investigated here revealed between three and five patriline.

Only one queen (from nest V0809) proved to be singly mated. This result demonstrates that multiple mating is the rule in *V. velutina* (Table 4).

Inference of invasion scenarios

In the first ABC analysis we considered that each French and Korean invasive population could originate either from an unsampled population deriving from one of the 4 native sampled populations (Zhejiang/Jiangsu, Yunnan, Vietnam or Indonesia), from an unsampled population directly deriving from the ancestral native population or from admixture events between 2 source populations. Both French and Korean invasive populations probably originated from an unsampled population derived from Zhejiang and Jiangsu with a posterior probability of 0.66 (95% CI = [0.57-0.76], and minimum Bayes Factor compared to the other 14 scenarios BF = 5.5) for France and 0.90 (95% CI = [0.85-0.94], BF = 15.2) for Korea, with no overlapping with CIs of any other scenarios. Confidence in scenario choice analysis was run to estimate type I and Type II error on the basis of 100 PODs per scenario. For both Korea and France, type I errors were large (0.64 and 0.59 respectively) but type II errors low (0.02 for both invasive populations) suggesting strong support for the selected scenario (Table 5). Using the Bayes theorem and according to Fagundes *et al.* (2007), we also computed the probability that the selected scenario is true given the posterior probability computed with ABC (in case of France this probability is $P(\text{source}=\text{Zhejiang/Jiangsu} | P(\text{source}=\text{Zhejiang/Jiangsu})=0.66)$). The computation of this probability takes into account the computed posterior probability, type I and II errors and the shape of the densities $f(P(\text{source} = \text{Zhejiang} / \text{Jiangsu}) | \text{source} = i)$ (not shown) obtained by simulations. In case of France, and because the priors of the scenarios are the same, this probability is computed as

$$P = \frac{P(P(\text{source} = \text{Zhejiang/Jiangsu}) = 0.66 | \text{source} = \text{Zhejiang/Jiangsu})}{\sum_{i=1}^n P(\text{source} = \text{Zhejiang/Jiangsu}) = 0.66 | \text{source} = i)}.$$

We obtained probabilities of 0.59 and 0.89 for France and Korea respectively.

Because the same scenario was selected for both invasive populations, we conducted an additional analysis to further describe their origin. We found that France and Korea did

not derive from each other but instead originated from 2 unsampled populations that independently derived from Zhejiang/Jiangsu. This scenario was chosen with a large posterior probability ($P = 0.88$ [0.81-0.96], minimum BF = 7.3), and low type I and type II errors (0.19 and 0.03). This resulted in a large probability that the selected scenario is true given the posterior probability (0.93). The scenario in which France and Korea independently originated from the same unsampled source that derived from sample Zhejiang/Jiangsu was poorly supported ($P = 0.1170$, 95% CI=[0.0422-0.1918]), and the 2 scenarios in which the invasive populations derived from each other (France from Korea and Korea from France) and ultimately from Zhejiang/Jiangsu were not supported ($P < 0.0003$, and the superior limits of 95% CIs < 0.001).

Number of founders

DIYABC was used to estimate the number of founders for the French invasive population. Considering the results of previous analysis, the Zhejiang/Jiangsu population was considered as the source. Two scenarios were distinguished. The first with a bottleneck after introduction (not differentiating males and females)(scenario A) and the second with two independent founder populations corresponding to females and their mates (scenario B).

Both direct estimate and logistic regression methods gave the greatest support to scenario B. Type I error (0.030) and type II errors (0.031) indicated that we achieved sufficient power to discriminate between the competing scenarios. We then used scenario B to estimate the demographic parameters. Posterior distributions of the demographic parameters of primary interest are shown in Fig. 8. Effective Zhejiang/Jiangsu population size(N_s) was estimated at 3200 (95% CI=[1 260–11 000]). The introduction time(t_1) also corresponding to the admixture time between the two unsampled subpopulations P_f and P_m was estimated at 7.48 (95% CI=[1.45-10.3]) years. Estimates of the effective number of diploid females individuals (N_{fm}) introduced in France was 0.99 (95% CI=[0.92-1.09]) individuals. The number of their mating haploid male (N_m) was estimated at 3.6 (95% CI = [2.00-17.26]) individuals doubling the estimate of 1.80 diploid individuals given by the software. Finally, the effective population size in France after the introduction (N_{inv}) was estimated at 938 (95%

CI=[15.0-6 010]). However, this parameter was found to be poorly estimated according to bias and RMSE computations (Table 5).

Discussion

The primary objective of this study was to genetically characterize the introduction events of *Vespa velutina* in Europe and Korea in order to infer the number of introduced populations, their origin and their size. Results are more reliable for Europe, as sampling effort was larger from this invaded territory than from Korea, though general conclusions may apply to both invasion histories.

Number of introduction events

It is now well-established that invasive populations frequently experience a genetic bottleneck due to transport of only a few individuals or colonies to a new location, and consequently lose a substantial amount of genetic diversity (Puillandre *et al.* 2008; Dlugosch & Parker 2008). A famous case of successful invaders is *Bombus terrestris*, the European bumblebee, which shows large decreases in diversity in its introduced range. In Tasmania, for example, this was apparently caused by the introduction of a very small number of individuals from a single source region, perhaps as few as two bees (Schmidt-Hempel *et al.* 2007). The high success of some species despite such large genetic losses is a paradox (Frankham 2005; Dlugosch & Parker 2008).

A remarkable characteristic of the invasive hornet populations in France and Korea is their impoverished genetic diversity compared with native populations from Asia, though genetic diversity was already low in native populations. A single mtDNA haplotype was found in both of these invasive populations. The same pattern has also been observed in other Vespidae species (Arevalo *et al.* 2004; Arca *et al.* unpublished data). To overcome the limitations of low mtDNA variability, we employed microsatellite markers, which have higher variability than mtDNA markers and a different mode of inheritance, and increased the number of individuals sampled per population (compared with mitochondrial analysis). Genetic diversity at microsatellite loci was also lower in all invasive populations than in native populations in Zhejiang/Jiangsu, Yunnan and Indonesia, with less than half the allelic richness, and lower levels of heterozygosity. Measures of genetic diversity are known to be sensitive to sample size (Muirhead *et al.* 2008). In this study, the number of individuals sampled was between 2.8 and 10.4 times higher for the French invasive population than for native populations. The lower genetic

diversity found in this invasive population is therefore not an artifact of low sampling effort. So we are confident about the reduced genetic diversity found in France. The same argument cannot be extended to the Korean invasive population. The total number of individuals sampled in this invasive area was low (only eight individuals sampled). Sampling needs to be expanded in Korea to confirm that there has been a bottleneck and to describe the genetic diversity of this invasive population more accurately.

Population genetic studies using microsatellite markers have also shown that native populations possess genetic structure within small areas. In contrast, we found that the French population had little detectable genetic structure in comparison with the native area. Finally, a signature of a bottleneck was detected in both French and Korean populations.

Taken together, highly reduced levels of genetic variation in introduced *V. velutina* populations along with significant bottleneck test results and lack of geographically or ecologically related population structure suggest that this hornet experienced single and severe founder events in both Korea and France. The sampled Vietnamese population shared the same genetic diversity pattern as invasive populations, although the sample size in this country is similar to that for Korea (eight individuals). The low diversity pattern may therefore be an artefact, or it could reflect a true decrease of the effective population size in the past. Further analyses are necessary, based on a larger sample from this country, to confirm or refute the hypothesis of population decline in Vietnam.

Geographical origin of invaders

Several studies have shown that identifying a source population precisely can be challenging if the potential source region is large, genetically homogeneous or not differentiated (Wares *et al.* 2005). In the case of our study, the source determination is theoretically optimal because genetic differentiation between native populations was high (Geller *et al.* 2010; Guillemaud *et al.* 2010). Another important result in the identification of source populations is that the two haplotypes detected in each invaded area to date were also found in two neighboring localities (37 km apart) in the two Chinese provinces of Jiangsu and Zhejiang. Furthermore, analysis of nuclear markers indicates that the recently established French and Korean populations are more closely

related to the eastern Chinese population than to the other Asian populations. These findings were confirmed by the assignment test conducted with GeneClass. The high percentage of individuals from the invaded areas correctly assigned to the Zhejiang/Jiangsu population and the high significance of these assignments support an introduction from this eastern Chinese coastal area.

However, even when differentiation between populations is high, a great sampling effort may be required to ensure that the real source population is not missed. To overcome this problem and to consider the possibility of erroneous source determination, we performed an approximate Bayesian computation analysis with the simulation of unsampled source populations. We found that all invasive samples originated from the eastern Chinese native area of *V. velutina*, and more specifically from populations that were genetically close to the sample from Zhejiang and Jiangsu. The inferred eastern China origin of the French invasive population analyzed here is consistent with factual information about the commercial exchanges that were probably responsible for the introduction of *V. velutina* into France. Such an event is also in agreement with increased importance of Asia as a source of Hymenopteran alien species in Europe (Rasplus *et al.* 2010).

We also demonstrated that the Korean and French invasive populations are independent, i.e. neither originated from the other. Therefore, at least two independent introductions of *Vespa velutina* took place from the same eastern Chinese native area and account for the current geographic distribution. The invasion of the Yellow-legged hornet is thus an additional example that can be added to the long list of multiple introductions in invasion biology (e.g. Kolbe *et al.* 2004; Facon *et al.* 2003; Genton *et al.* 2005; Voisin *et al.* 2005; Kelly *et al.* 2006).

Estimated number of introduced individuals

Several aspects of the data suggested that *V. velutina* the invasion of Europe arose from the introduction of a single founder. This hypothesis is supported by the presence of a single mitochondrial haplotype in France. Indeed, each colony is generally founded by a single diploid female, to whom all progeny are related, resulting in the presence of a unique mtDNA in the colony and future queens. Results associated with nuclear

compartment markers are, however, not compatible with the introduction of a singly-mated female for a number of reasons. First, more than four alleles are observed at many loci in France. Second, the difference between mitochondrial and nuclear diversity is more pronounced than in other species that have experienced the same invasion pattern (Mikheyev *et al.* 2009). Third, bimodal distribution of allele frequencies in France suggested that the French population originated partly from a bottlenecked population (presence of alleles at high frequency) and partly from an outbred population (occurrence of low frequency alleles). Combined mitochondrial and nuclear data suggest that the establishment of the present population of yellow-legged hornet in France would have been possible by the introduction of a single queen (bottlenecked population) fertilized by several males (outbred population). The analysis of the colonies and the fact that eight of the nine nests analyzed are monogynous and polyandrous corroborate this hypothesis.

Lye *et al.* (2011) successfully used approximate Bayesian computation to estimate demographic parameters of the introduction history of bumblebees to New Zealand. For this species, intentionally introduced for the pollination of the fodder crop *Trifolium pratense* (Hopkins 1914), many historical data were known: the number and the geographical origin of individuals introduced and the date of introduction. Here, we conducted a more detailed analysis for a species accidentally introduced and for which historical data were limited to the date of first observation. We used an ABC approach to test the hypothesis that the invasion of France originated from the introduction of a small number of founder females fertilized by several males. The ABC analyses performed to elucidate the *V. velutina* invasive scenario confirmed that all of French hornet samples were likely derived from a single female, and the effective number of their haploid male mates (P_m) was estimated at 3.6 (CI = [2.00-17.26]). This result is consistent with the independent colony analysis. A precise estimation could not be obtained for the invasive Korean population, due to small sample size.

Invasive success despite a small propagule size

Several studies on conservation genetics have demonstrated that reduced genetic variation due to genetic drift following a founder effect limits the ability of a population to adapt, and small population size increases the risk of extinction (Frankham & Ralls

1998; Sakai *et al.* 2001; Allendorf & Lundquist 2003). Particularly, in isolated haplodiploid populations, where sex is often determined by a single locus, increased homozygosity due to inbreeding increases the production of non viable or effectively sterile diploid males, which reduces population growth rates and effective sizes – thus potentially creating a rapid extinction vortex (Zayed *et al.* 2007; Dlugosch & Parker 2008). For example, despite the relatively large founder population, substantial numbers of diploid males can be seen in US fire ant populations (Mikheyev *et al.* 2009). Nevertheless, the literature on intentional insect introductions for biological control provides several examples of successful establishment from a few (< 10) individuals (Simberloff 1989; Grevstad 1999; Zayed *et al.* 2007). Unfortunately, a key piece of information is missing, which is the rate of unsuccessful accidental introductions. Species that were accidentally introduced and then died out or that are in decline are generally not studied and consequently no link with genetic diversity can be drawn. A noticeable exception concerns the few species in which spontaneous collapse has been repeatedly observed but was not correlated with genetic diversity (Simberloff & Gibbons 2004; Cooling *et al.* 2011).

The invasion of the Yellow-legged hornet in France represents an exemplary case of invasive success from a very small propagule size. Paradoxically, *V. velutina* appears to be able to establish itself even after a severe genetic bottleneck resulting from the introduction of a single female (although multi mated). Furthermore, the species succeeded in two independent cases: introductions in Europe and in Korea. Several species of ants and wasps have become highly invasive in their introduced range, but they generally have not experienced reductions in propagule pressure on the same scale as *V. velutina* (Giraud *et al.* 2002; Tsutsui & Suarez 2003; Johnson & Starks 2004; Ross & Shoemaker 2008). A rare example is the case of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* Reich, 1793, for which there is evidence that only a single female or a small group of sisters was introduced to the islands of Guadeloupe. The unusual, largely clonal, reproductive strategy of *A. octospinosus* may have enhanced its success as an invasive species (Mikheyev 2008; Mikheyev *et al.* 2009).

Admittedly, many biological and environmental factors might have contributed to invasiveness of *V. velutina* in France and counterbalanced the negative effect of

bottleneck: the suitable climatic conditions, the abundance of honeybees, and the low level of interspecific competition that the species met in Europe may have permitted the rapid population growth observed in France (Villemant *et al.* 2011). Additionally, our results also highlight the possible contribution that reproductive system traits of this species may have made to the success of the invasion.

In this paper we demonstrated that *V. velutina* is a polyandrous species. According to a recent data compilation (Hughes *et al.* 2008), *V. velutina* is the only *Vespa* species to date to present moderate polyandry (2-10 effective mates) whereas *V. crabro* and *V. mandarina* Smith, 1852, exhibit facultative low polyandry and *V. ducalis* Smith, 1852, is monoandrous. Available data highlight the fact that *V. velutina* queens exhibit one of the highest mean effective mating frequencies among the Vespidae. Like all other *Vespa* species for which data are available, *V. velutina* is monogynous, in agreement with the often observed negative relationship between polyandry and polygyny (Hughes *et al.* 2008; Leniaud *et al.* 2011). Despite the cost of multiple mating, polyandry could be beneficial to colonies, not only because monogynous queens need sperm from several males in order to produce enough workers, but also because it may offer several other genetic advantages that may have determined the success of invasion (Crozier & Fjerdingstad 2001). Notably, multiple mating implies an increased genetic variation among offspring (Yasui 1998) that can improve the resistance of the whole colony to parasites or pathogens (Hamilton 1987; Sherman *et al.* 1988; Schmid-Hempel & Crozier 1999) and increase colony survival under variable environmental conditions (Crozier & Page 1985), which may be of importance for adaptation to a new environment in an invaded area. Genetic reduction observed in a population developed from a single female is far less severe when this female is multi-mated than when it is only singly mated. As a result, polyandry may also decrease diploid male load by decreasing the production of diploid males resulting from the sex determination mechanism (Page 1980; Crozier & Page 1985; Jennions & Petrie 2000).

Another reason for *Vespa velutina* invasive success could be, ironically, the haplodiploid sex determination system of the Hymenoptera, which could make haplodiploids more resistant to inbreeding. In other words, inbreeding is expected to have a less severe impact on fitness in haplodiploid species due to the purging of recessive deleterious

alleles during the haploid (male) stage (Crozier 1985, Werren 1993; Gerloff & Schmid-Hempel, 2005).

Conclusion

The results of this study, based on a large sample size and data from a number of highly informative genetic markers provide the first robust reconstruction of the *V. velutina* invasion in Europe. The congruence between the results based on the different classes of markers and different analytical approaches adds weight to the credibility of our estimates.

Clearly this species has proven its high invasive potential: our genetic study has shown that a single queen introduction can initiate a full-scale invasion. This discovery represents a challenge to management practices intended to control such introductions or to remove them from non-native environments. The rapid detection at the port of entry seems to be the best way to prevent a large scale infestation, although just one or a handful of escaped founders can render management actions ineffective.

It is possible that other invasive species share these characteristics and can become invaders despite a very small number of individuals introduced. It is therefore a priority to distinguish these species so that special caution may be applied to their management, as traditional practices may not be sufficient for their control.

Acknowledgments

We would like to thank all the French beekeepers and associations that kindly provided us with Asian Yellow-legged hornet samples from France. We also thank our colleagues Alain Roques (INRA, Orléans), Agnès Rortais (CNRS, Gif-sur-Yvette), Pierre Tripotin (MNHN, Paris), Tan Ken (Chinese Academy of Sciences, China), Yayuk Suhardjono and Oscar Effendy (Museum of Bogor, LIPI, Indonesia), Truong Quang Tam (Institute of Tropical Biology, Vietnam) for help with sample collection from Asia. Cyril Nadeau, Delia Dupré and Ugoline Godeau provided technical help in the laboratory. This study was financially supported by France AgriMer (Programme communautaire pour l'Apiculture, 2008-2011) and IRD and CNRS core budgets. Collecting missions were supported by the MNHN for Vietnam (PPF 2008); Indonesia (ATM Biodiversité 2010), China (ATM Formes 2010).

References

- Abrol DP (1994) Ecology, behaviour and management of social wasp, *Vespa velutina* smith (Hymenoptera: Vespidae), attacking honeybee colonies. *Korean Journal of Apiculture*, **9**, 5.
- Allendorf FW, Lundquist LL (2003) Introduction: Population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology*, **17**, 24-30.
- Arca M, Capdevielle-Dulac C, Villemant C, *et al.* (2011) Development of microsatellite markers for the Yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina*, a major threat for European bees. *Conservation Genetics Resources*. Doi: 10.1007/s12686-011-9525-1
- Arevalo E, Zhu Y, Carpenter JM, Strassmann JE (2004) The phylogeny of the social wasp subfamily Polistinae: Evidence from microsatellite flanking sequences, mitochondrial COI sequence, and morphological characters. *Bmc Evolutionary Biology*, **4**.
- Aron S (2001) Reproductive strategy: an essential component in the success of incipient colonies of the invasive Argentine ant. *Insectes Sociaux*, **48**, 25-27.
- Banda HJ, Paxton RJ (1991) Pollination of greenhouse tomatoes by bees. *Acta Horticulturae*, **288**, 194-198.
- Beaumont, MA, Zhang W, Balding DJ (2002). Approximate Bayesian Computation in Population Genetics. *Genetics*, **162**, 2025-2035.
- Beggs JR (2001) The ecological consequences of social wasps (*Vespula* spp.) invading an ecosystem that has an abundant carbohydrate resource. *Biological Conservation*, **99**, 17-28.
- Beggs JR, Brockerhoff EG, Corley JC, *et al.* (2011) Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. *Biocontrol*, **56**, 505-526.
- Bertorelle G, Benazzo A, Mona S (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular Ecology*, **19**, 2609-2625.

- Buttermore RE (1997) Observations of successful *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in southern Tasmania. *Australian Journal of Entomology*, **36**, 251-254.
- Carpenter JM, Kojima J (1997) Checklist of the species in the subfamily Vespinae (Insecta: Hymenoptera: Vespidae). *Natural history bulletin of Ibaraki University*, **1**, 51-92.
- Castro L, Pagola-Carte S (2010) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae), recolectada en la Península Ibérica. *Heteropterus Revista de Entomología*, **10**, 193-196.
- Chakraborty R, Jin L (1993) A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. In: *DNA Fingerprinting: State of the Science* (eds Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ), pp. 153-175. Birkhäuser, Switzerland.
- Chapman RE, Bourke AFG (2001) The influence of sociality on the conservation biology of social insects. *Ecology Letters*, **4**, 650-662.
- Choi MB, Martin SJ, Lee JW (2011) Distribution, spread and impact of the invasive hornet *Vespa velutina* in South Korea. *Entomological Research*, **41**, 276.
- Cooling M, Hartley S, Sim DA, LesterPJ (2011) The widespread collapse of an invasive species: Argentine ants (*Linepithema humile*) in New Zealand. *Biology Letters*. doi: 10.1098/rsbl.2011.1014
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA *et al.* (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*, **24**, 2713-2719.
- Crozier R, Fjerdingstad EJ (2001) Polyandry in social Hymenoptera-disunity in diversity? *Annales Zoologici Fennici*, 267-285.

- Crozier RH, Page RE (1985) On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **18**, 105–115.
- Crozier RH (1985) Adaptive consequences of male haploidy. — In: *Spider mites. Their biology, natural enemies and control* (eds Helle W, Sabeli MW), Vol. 1A, pp. 201–222. Elsevier, Amsterdam.
- Daly D, Archer ME, Watts PC, *et al.* (2002) Polymorphic microsatellite loci for eusocial wasps (Hymenoptera : Vespidae). *Molecular Ecology Notes*, **2**, 273.
- Davidson DW (1998) Resource discovery versus resource domination in ants: a functional mechanism for breaking the trade-off. *Ecological Entomology*, **23**, 484–490.
- De Haro L, Labadie M, Chanseau P, Cabot C, Blanc-Brisset I, Penouil F (2009) Medical consequences of the Asian black hornet (*Vespa velutina*) invasion in Southwestern France. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, **55**, 650–652.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, **17**, 431.
- Dvorak L (2006) Oriental Hornet *Vespa orientalis* Linnaeus, 1771 found in Mexico (Hymenoptera, Vespidae, Vespinae). *Entomological Problems*, **36**, 80.
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology*, **19**, 4113–4130.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, **1**, 47–50.
- Facon B, Pointier JP, Glaubrecht M, *et al.* (2003) A molecular phylogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic Thiarid snails. *Molecular Ecology*, **12**, 3027–3039.

- Fagundes NJR, Ray N, Beaumont M, *et al.* (2007) Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (PNAS)*, **104**, 17614-17619.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567-1587
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **5**, 294-299.
- Foucaud J, Jourdan H, Le Breton J *et al.* (2006) Rare sexual reproduction events in the clonal reproduction system of introduced populations of the little fire ant. *Evolution*, **60**, 1646-1657.
- Fournier D, De Biseau JC, Aron S (2009) Genetics, behaviour and chemical recognition of the invading ant *Pheidole megacephala*. *Molecular Ecology*, **18**, 186-199.
- Frankham R, Ralls K (1998) Conservation biology: inbreeding leads to extinction. *Nature*, **392**, 441-442.
- Frankham R (2005) Invasion biology - Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, **94**, 385-385.
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**, 305-318.
- Geller JB, Darling JA, Carlton JT (2010) Genetic Perspectives on Marine Biological Invasions. *Annual Review of Marine Science*, **2**, 367-393.
- Genton BJ, Shykoff JA, Giraud T (2005) High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*, **14**, 4275-4285.
- Gerloff CU, Schmid-Hempel P (2005) Inbreeding depression and family variation in a social insect, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Oikos*, **1**, 67-80.

- Giraud T, Pedersen JS, Keller L (2002) Evolution of supercolonies: The Argentine ants of southern Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (PNAS)*, **99**, 6075-6079
- Goldstein DB, Linares AR, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, **139**, 463-471.
- Goudet J (1995) fstat, version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
- Grevstad FS (1999) Experimental invasions using biological control introductions: the influence of release size on the chance of population establishment. *Biological Invasions*, **1**, 313-323.
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, Cornuet JM, Estoup A (2010) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity*, **104**, 88-99.
- Hajibabaei M, deWaard JR, Ivanova NV *et al.* (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (Series B)*, **360**, 1959-1967.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95 / 98 / NT. *Nucleic acids symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hamilton WD (1987) Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution. In: *Animal Societies, Theories and Facts* (eds ItôY, Brown JL, Kikkawa JJ), pp. 81-102. *Japan Scientific Societies Press, Tokyo*.
- Hasegawa E, Takahashi J (2002) Microsatellite loci for genetic research in the hornet *Vespa mandarinia* and related species. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 306.
- Haxaire J, Bouguet JP & Tamisier JP (2006) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hym., Vespidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, **111**, 194-194.

- Hee JJ, Holway DA, Suarez AV, Case TJ (2000) Role of propagule size in the success of incipient colonies of the invasive Argentine ant. *Conservation Biology*, **14**, 559-563.
- Holway DA, Lach L, Suarez AV, Tsutsui ND, Case TJ (2002) The causes and consequences of ant invasions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 181-233.
- Hughes WOH, Ratnieks FLW, Oldroyd BP (2008) Multiple paternity or multiple queens: two routes to greater intracolony genetic diversity in the eusocial Hymenoptera. *Journal of evolutionary biology*, **21**, 1090-1095.
- Ings TC, Schikora J, Chittka L (2005) Bumblebees, humble pollinators or assiduous invaders? A population comparison of foraging performance in *Bombus terrestris*. *Oecologia*, **144**, 508-516.
- Inoue M, Endo T (2008) Below-ground host location by *Campsomeriella annulata* (Hymenoptera : Scoliidae), a parasitoid of scarabaeid grubs. *Journal of Ethology*, **26**, 43-50.
- IUCN The World Conservation Union. 2000. IUCN. Guidelines for the prevention of biodiversity loss due to biological invasion.
- Jennions MD, Petrie M (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **75**, 21-64.
- Johnson RN, Starks PT (2004) A surprising level of genetic diversity in an invasive wasp: *Polistes dominulus* in the northeastern United States. *Annals of the Entomological Society of America*, **97**, 732-737.
- Jung C, Kim DW, Lee HS, Baek H (2008) Some biological characteristics of a new honeybee pest, *Vespa velutina nigrithorax* Buysson 1905 (Hymenoptera: Vespidae). *Korean Journal of Apiculture*, **24**, 61-65.
- Kelly DW, Muirhead JR, Heath DD, Macisaac HJ (2006) Contrasting patterns in genetic diversity following multiple invasions of fresh and brackish waters. *Molecular Ecology*, **15**, 3641-3653.

- Ken T, Hepburn HR, Radloff SE, *et al.* (2005) Heat-balling wasps by honeybees. *Naturwissenschaften*, **92**, 492-495.
- Kim JK, Choi M, Moon TY (2006) Occurrence of *Vespa velutina* Lepeletier from Korea, and a revised key for Korean *Vespa* species (Hymenoptera : Vespidae). *Entomological Research*, **36**, 112.
- Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LRG, *et al.* (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, **431**, 177-181.
- Langella O (2007) Populations 1.2.30: populations genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). France. http://bioinformatics.org/*tryphon/populations/
- Leniaud L, Heftez A, Grumiau L, Aron S (2011) Multiple mating and supercoloniality in *Cataglyphis* desert ants. *Biological Journal of the Linnean Society*, **104**, 866-876.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet JM, *et al.* (2010) Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *Plos One*, **5**.
- Lombaert E, Guillemaud T, Thomas CE, *et al.* (2011) Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular Ecology*, **20**, 4654-4670.
- López S, González M, Goldarazena A (2011), ***Vespa velutina*** Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae): first records in Iberian Peninsula. *EPPO Bulletin*, **41**, 439-441. doi: 10.1111/j.1365-2338.2011.02513.x
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M (2001) *100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database*. Species Survival Commission. World Conservation Union, New Zealand
- Luikart G, Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, **12**, 228-237.

- Luikart G, Allendorf F, Cornuet JM, Sherwin W (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, **89**, 238.
- Lye GC, Lepais O, Goulson D (2011) Reconstructing demographic events from population genetic data: the introduction of bumblebees to New Zealand. *Molecular ecology*, **20**, 2888-900.
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, *et al.* (2000) Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications*, **10**, 689-710.
- Matsuura M, Yamane S (1990) *Biology of the vespine wasps* Springer-Verlag, Berlin ; New York.
- Matthews RW, Goodisman MA, Austin AD, Bashford R (2001) The introduced English wasp *Vespula vulgaris* (L.) (Hymenoptera: Vespidae) newly recorded invading native forests in Tasmania. *Australian Journal of Entomology*, **39**, 177 - 179.
- Mikheyev, AS (2008) History, genetics and pathology of a leaf-cutting ant introduction: a case study of the Guadeloupe invasion. *Biological Invasions*, **10**, 467-473.
- Mikheyev AS, Bresson S, Conant P (2009) Single-queen introductions characterize regional and local invasions by the facultatively clonal little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Molecular Ecology*, **18**, 2937-2944.
- Moilanen A, Sundström L, Pedersen JS (2004) *MATESOFT: a Program for Genetic Analysis of Mating Systems* 1.0. Institute of Biology, University of Copenhagen, Copenhagen. Available at: [http:// www.bi.ku.dk/JSPedersen/MateSoft.htm](http://www.bi.ku.dk/JSPedersen/MateSoft.htm).
- Moller H (1996) Lessons for invasion theory from social insects. *Biological conservation*, **78**, 125-142.
- Muirhead JR, Gray DK, Kelly DW, Ellis SM, Heath DD & Macisaac HJ (2008) Identifying the source of species invasions: sampling intensity vs. genetic diversity. *Molecular ecology*, **17**, 1020-35.

- Nagamitsu T, Yamagishi H (2009) Nest density, genetic structure, and triploid workers in exotic *Bombus terrestris* populations colonized Japan. *Apidologie*, **40**, 429-440.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Orivel J, Grangier J, Foucaud J, *et al.* (2009) Ecologically heterogeneous populations of the invasive ant *Wasmannia auropunctata* within its native and introduced ranges. *Ecological Entomology* **34**, 504-512.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, **13**, 55-65.
- Page RE Jr (1980) The evolution of multiple mating behavior by honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Genetics*, **96**, 263-273.
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- Paini DR, Roberts JD (2005) Commercial honey bees (*Apis mellifera*) reduce the fecundity of an Australian native bee (*Hylaeus alcyoneus*). *Biological Conservation*, **123**, 103-112.
- Pascal M, Lorvelec O (2005) Holocene turnover of the French vertebrate fauna. *Biological Invasions*, **7**, 99-106.
- Pascual M, Chapuis MP, Mestres F *et al.* (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology*, **16**, 3069-3083.
- Perrard A, Haxaire J, Rortais A, Villemant C (2009) Observations on the colony activity of the Asian hornet *Vespa velutina* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae) in France, 119-127.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.

- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM *et al.* (2004) GENECLASS 2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, **95**, 536.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Puillandre N, Dupas S, Dangles O, *et al.* (2008) Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions*, **10**, 319-333.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (PNAS)*, **94**, 9197–9201.
- Rasplus JY, Villemant C, Paiva MR, Delvare G, Roques A (2010) Hymenoptera. In: *Arthropod invasions in Europe. BioRisk 4* (eds. Roques A, Kenis M, Lees D) , pp. 669–776. Pensoft, Sofia, Moscow.
- Rome Q, Muller F, Gargominy O, Villemant C (2009) Bilan 2008 de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera: Vespidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, **114**, 297-302.
- Rortais A, Villemant C, Gargominy O, Rome Q, Haxaire J, Papachristoforou A, Arnold G (2010) A new enemy of honeybees in Europe: The Asian hornet *Vespa velutina*. In: *Atlas of Biodiversity Risks – from Europe to the Globe, From Stories to Maps* (eds Settele J), p. 11. Pensoft, Sofia, Moscow.
- Ross KG, Shoemaker DD (2008) Estimation of the number of founders of an invasive pest insect population: the fire ant *Solenopsis invicta* in the USA. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **275**, 2231-2240.
- Roubik DW (1989). *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. New York, Cambridge University Press, 514 pp.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496–2497.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **32**, 305-332.

- Schmid-Hempel P, Crozier RH (1999) Polyandry versus polygyny versus parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **354**, 507-515.
- Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Brunner PC, Seeman OD, Allen GR (2007) Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. *Heredity*, **99**, 414-422.
- Shaw F, Weidhaas J (1956) Distribution and habits of the giant hornet in North America. *Journal of Economic Entomology*, **49**, 275
- Sherman PW, Seeley TD, Reeve HK (1988) Parasites, pathogens, and polyandry in social Hymenoptera. *American Naturalist*, **131**, 602-610.
- Simberloff D (1989) Which insect introductions succeed and which fail? In: *Biological Invasions: A Global Perspective* (eds Drake JA et al.), pp. 61-75. John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Simberloff D, Gibbons L (2004) Now you see them, now you don't – population crashes of established introduced species. *Biological Invasions*, **6**, 161-172
- Smith DR (1991) African bees in the Americas: Insights from biogeography and genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, **6**, 17-21.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599
- Tan K, Radloff S, Li JJ, Hepburn HR, Yang MX, Zhang LJ, Neumann P (2007) Bee-hawking by the wasp, *Vespa velutina*, on the honeybees *Apis cerana* and *A. mellifera*. *Die Naturwissenschaften*, **94**, 469-72.
- Tsutsui ND, Suarez AV (2003) The colony structure and population biology of invasive ants. *Conservation Biology*, **17**, 48-58.
- Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2001) Relationships among native and introduced populations of the Argentine ant (*Linepithema humile*) and the source of introduced populations. *Molecular Ecology*, **10**, 2151-2161.

- Villemant C, Haxaire J, Streito JC (2006) Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, **111**, 535.
- Villemant C (2008) *Apis cerana* se défend contre *Vespa velutina* : observations dans le massif forestier du Bi Doup, Vietnam. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, **113**, 312.
- Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, *et al.* (2011) Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina* nigrithorax across Europe and other continents with niche models. *Biological Conservation*, **144**, 2142-2150.
- Voisin M, Engel CR, Viard F (2005) Differential shuffling of native genetic diversity across introduced regions in a brown alga: Aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)*, **102**, 5432-5437.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Werren JH (1993) The evolution of inbreeding in haplodiploid organisms. In: *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding* (eds Thornhill NW), pp. 42-59. University of Chicago Press, Chicago.
- Winston ML (1992) The biology and management of Africanized honey bees. *Annual Review of Entomology*, **37**, 173-193.
- Yasui Y (1998) The “genetic benefits” of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 246-250.
- Zayed A, Constantin SA, Packer L (2007) Successful Biological Invasion despite a Severe Genetic Load. *Plos One*, **2**.

Figures and tables

Figure 8: Map of the six regions sampled for the yellow-legged hornet *Vespa velutina*. Each point in the map represents a sampled locality. In grey we show the known distribution range of *V. velutina*. The pie chart displays haplotype frequency for the mitochondrial COI marker in each sampled region and is proportional to the sample effort. The haplotype names correspond to the ones described in the maximum parsimony tree (figure 3) and are indicated in the pie chart associated with a color code. † number of samples used for mitochondrial analysis; ‡number of samples for microsatellite analysis.

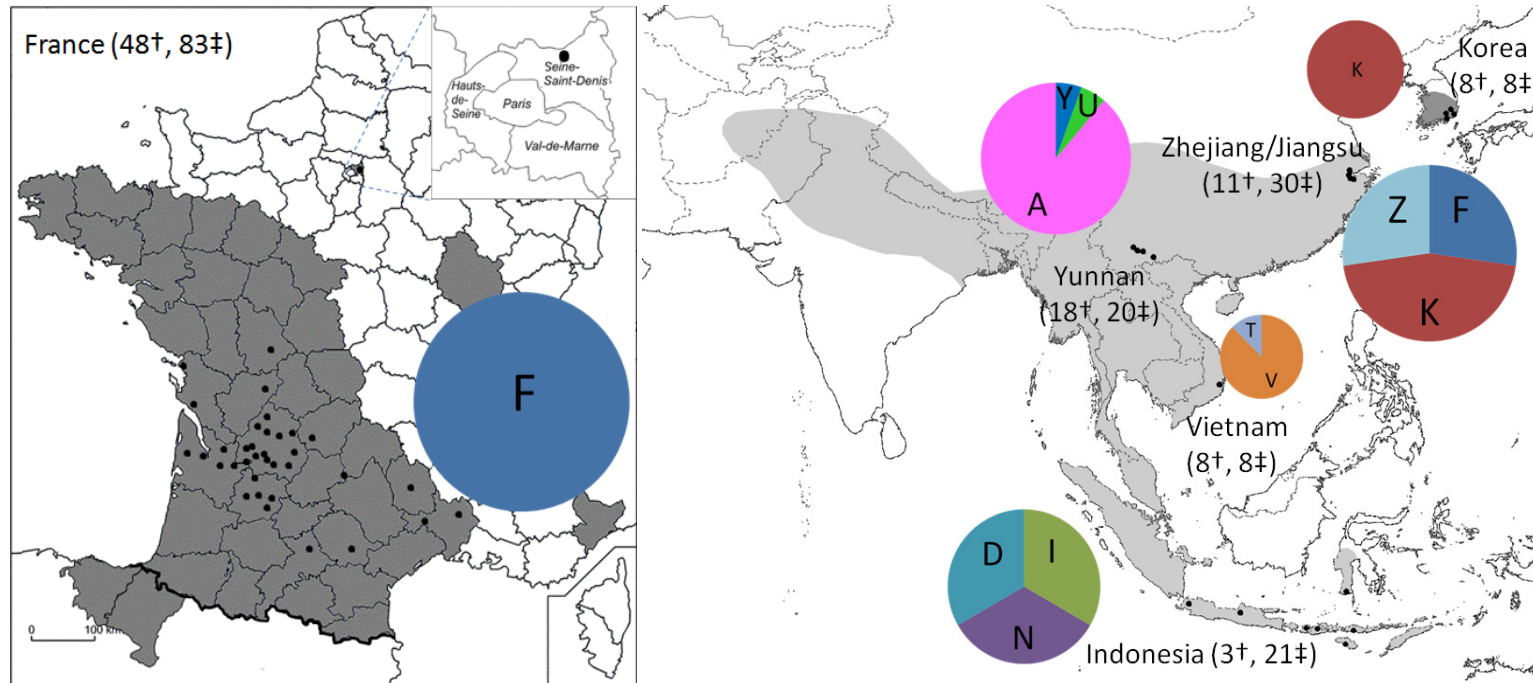
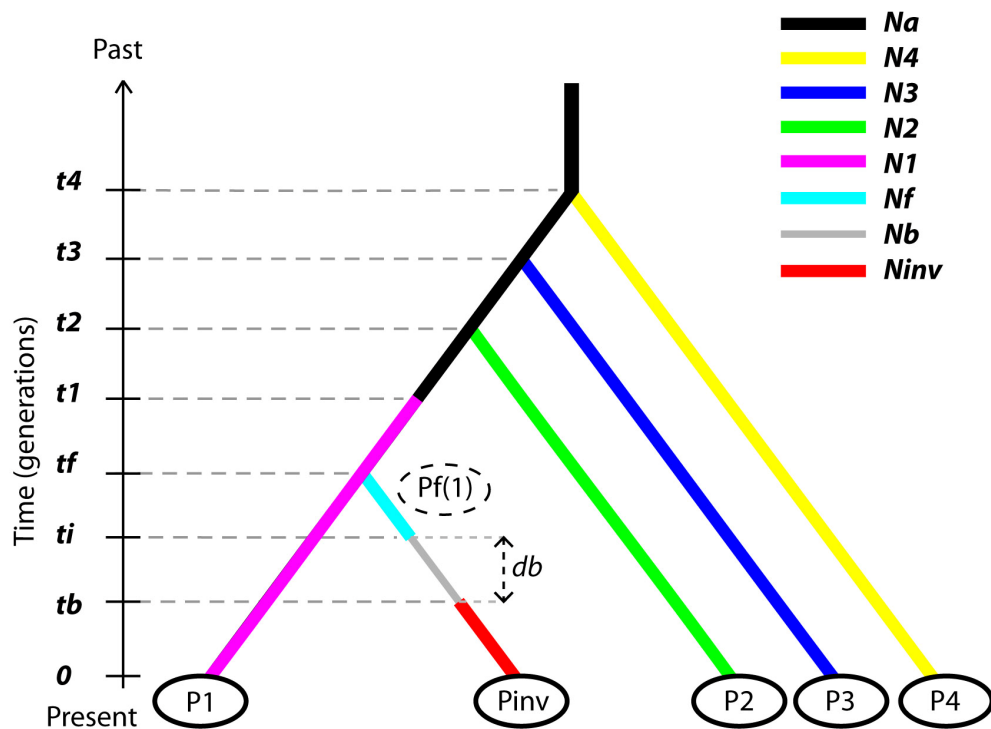


Figure 9: Graphic representation of 3 of the fifteen competing invasion scenarios considered in the ABC analysis. a) Sampled origin scenario (SOS): one of four possible SOS scenario where a subset (Pf(1)), issued from one of the sampled populations (P1), was chosen as source population for the invasive population (Pinv). b) Unsourced origin scenario (UOS) where the source of the introduced populations (Pinv) was an unsampled population (Pg) genetically distant from the 4 sampled native populations. c) Admixture origin scenario (AOS): one of ten hybrid scenarios in which introduced hornets population (Pinv) derived by admixture from a subset (Pf(1) and Pf(2)) of P1 and P2 source populations respectively. Circles are used to represent all populations considered in the analysis. Dashed circle indicates that the population was not sampled. Colors indicate effective population sizes. Historical and demographic parameters were the same for all scenario. Time 0 is the sampling date. The invasive population Pinv was founded t_i generations ago and N_b was the effective number of founders. After db generations (bottleneck duration), Pinv reached a larger stable effective population size, N_{inv} , t_b generations ago. The native populations, P1, P2, P3, P4 and Pg, merged in an ancestral unsampled population t_1 , t_2 , t_3 , t_4 and t_g generations ago respectively. Effective population sizes of these native populations were stable over time and equal to N_1 , N_2 , N_3 , N_4 and N_g respectively. When admixture occurs, the admixture rate ra is the genetic contribution of each native population. Time is expressed in number of generations and is not represented to scale.

a) Sampled origin scenario (SOS)



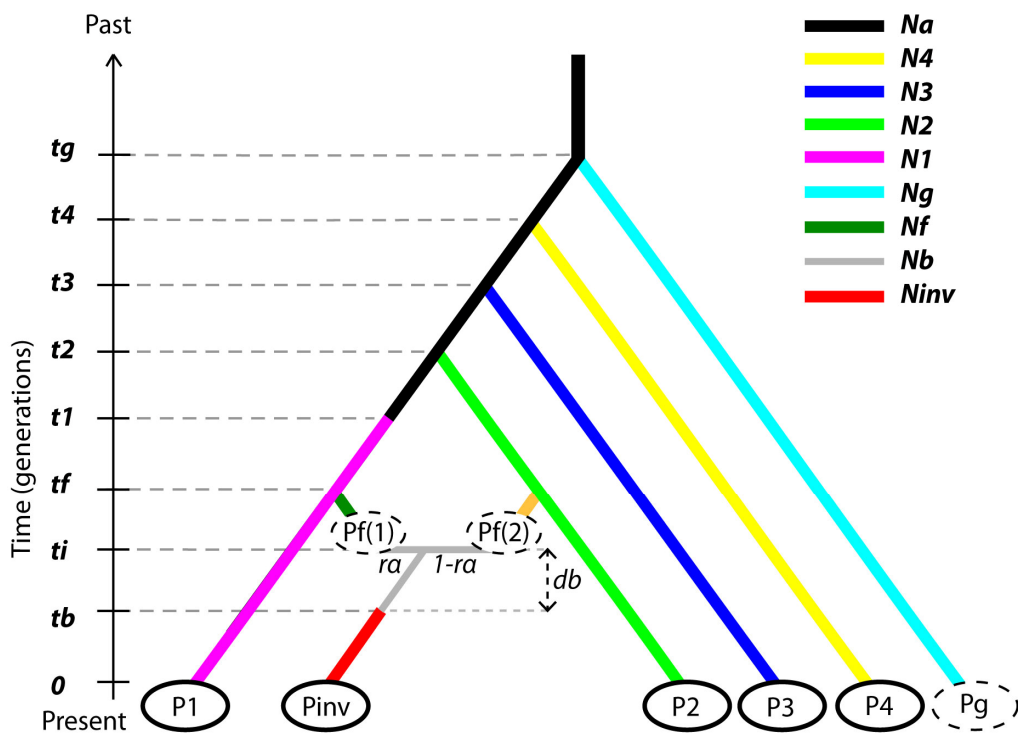
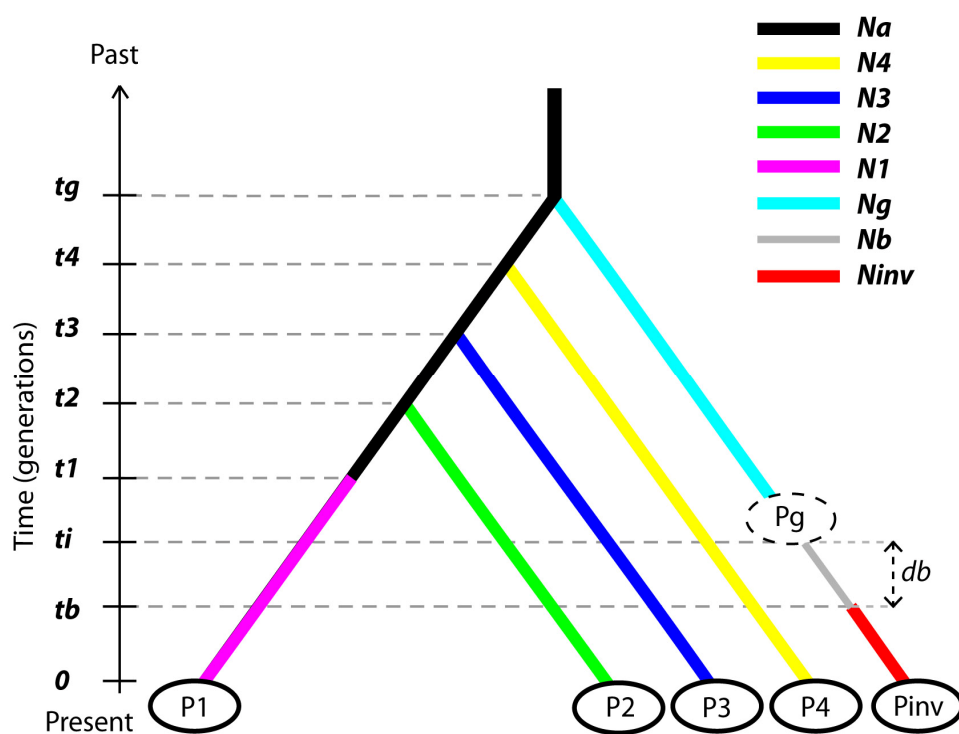
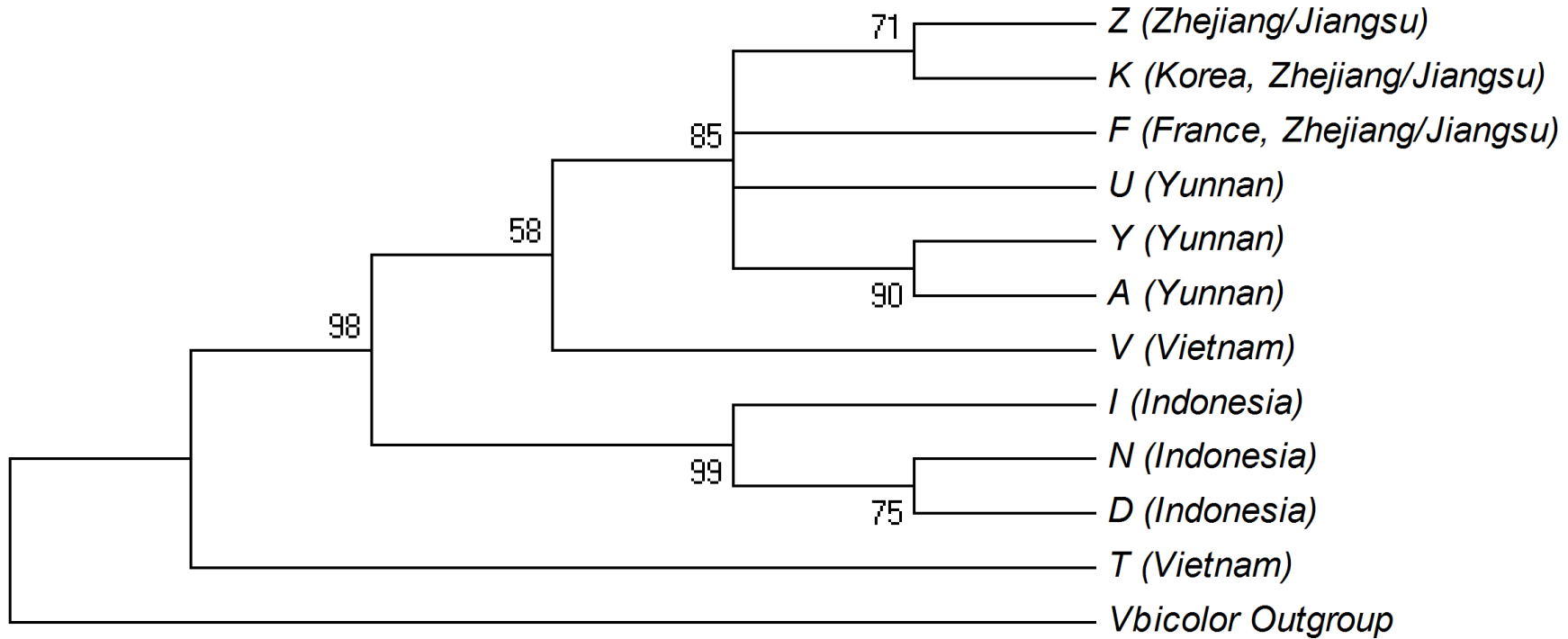


Figure 10 : Maximum Parsimony (MP) consensus tree inferred with MEGA 4 from COI haplotype obtained from *Vespa velutina*. Bootstrap sampling was applied (1000 heuristic search replicates) and the values are shown at the nodes. *Vespa bicolor* was used as outgroup.

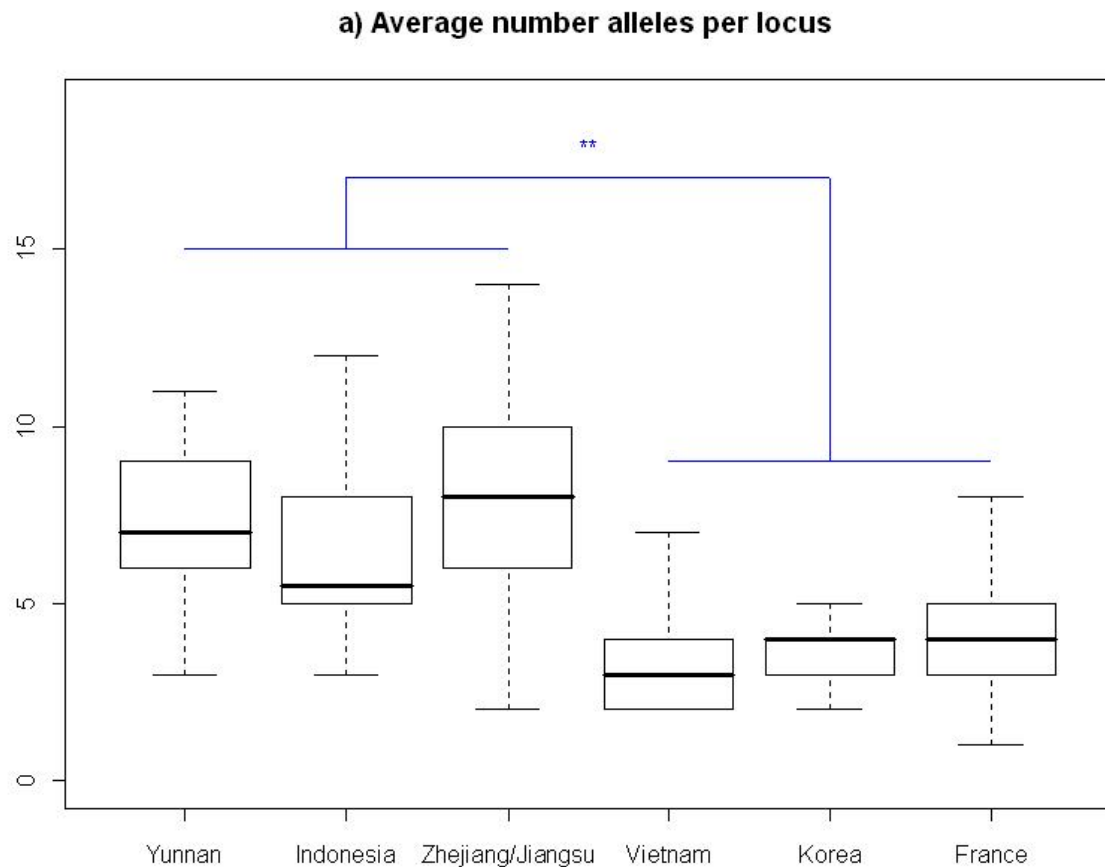


Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

Table 2 Summary information for the twenty-two microsatellite loci and for the six populations. Invasive populations are in bold type. Locus-population combinations that were out of Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction ($p < 0.002$) are in bold with asterisks.

Locus	France		Korea		Zhejiang/Jiangsu		Yunnan		Vietnam		Indonesia	
	N	HE	N	HE	N	HE	N	HE	N	HE	N	HE
LIST2003	6	0.650*	—	—	—	—	7	0.820*	5	0.688	4	0.648
VMA-8	6	0.532*	—	—	2	0.375	9	0.866*	7	0.727	8	0.847
VMA-6	3	0.540	—	—	—	—	3	0.499	2	0.305	3	0.403
LIST2018B	5	0.623*	—	—	—	—	5	0.643	3	0.625	5	0.750
LIST2004B	5	0.500	3	0.531	5	0.778	7	0.789*	2	0.375	5	0.612
LIST2015	8	0.688*	3	0.561	11	0.843	8	0.786	3	0.398	8	0.798*
LIST2020B	6	0.563*	2	0.444	6	0.780	9	0.796	4	0.484	10	0.855*
R4-26	5	0.576*	4	0.578	6	0.707	7	0.776	3	0.461	3	0.486*
D2-185	3	0.49	5	0.735	7	0.705	7	0.819*	4	0.555	5	0.709*
R4-100	5	0.657*	4	0.742	12	0.877	9	0.805*	3	0.602	4	0.464
R4-114	5	0.663*	4	0.609	9	0.795	6	0.759	4	0.68	4	0.663*
D3-15	5	0.692*	4	0.484	10	0.798	6	0.790	3	0.477	3	0.156
R1-36	3	0.425	3	0.617	6	0.76	9	0.834	4	0.609	8	0.762
R1-75	3	0.628	3	0.571	4	0.569	3	0.616	3	0.320	4	0.661
R1-77	2	0.115*	3	0.57	6	0.793	6	0.710*	2	0.492	6	0.705*
R1-80	2	0.450	4	0.742	14	0.859	11	0.871*	6	0.813	7	0.659*
R4-33	2	0.489	3	0.500	9	0.829	8	0.776*	4	0.734	5	0.771
R1-137	3	0.641	4	0.735	11	0.856	11	0.873*	7	0.836	6	0.732*
R1-169	2	0.368	2	0.492	7	0.666	7	0.831	2	0.219	3	0.516
D2-142	1	Monomorphic	5	0.75	10	0.857	8	0.789*	3	0.406*	11	0.880
R3-115	4	0.652	0	0	9	0.858	8	0.856*	2	0.459	8	0.826
R1-158	4	0.665	4	0.602	8	0.832	6	0.736	2	0.219	3	0.522

Figure 11 : Average number of alleles per locus, effective number of alleles and Nei's diversity index across twenty-two microsatellite loci and the invasive and native populations of *Vespa velutina*. All pairwise comparisons between the six populations for these 3 indices were performed. Significant differences between populations are summarized on the graph. Statistically significant values are indicated with an asterisk (***, $p < 0.001$. **, $p < 0.01$. *, $p < 0.05$).



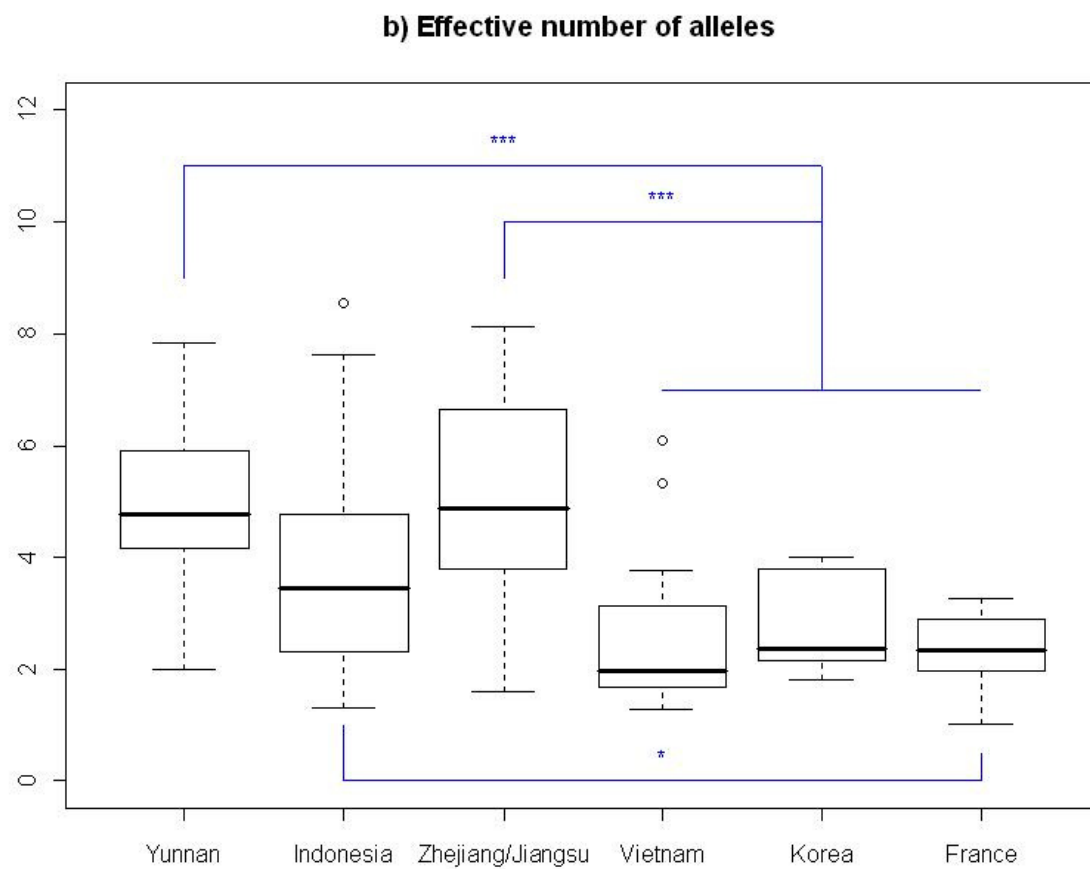
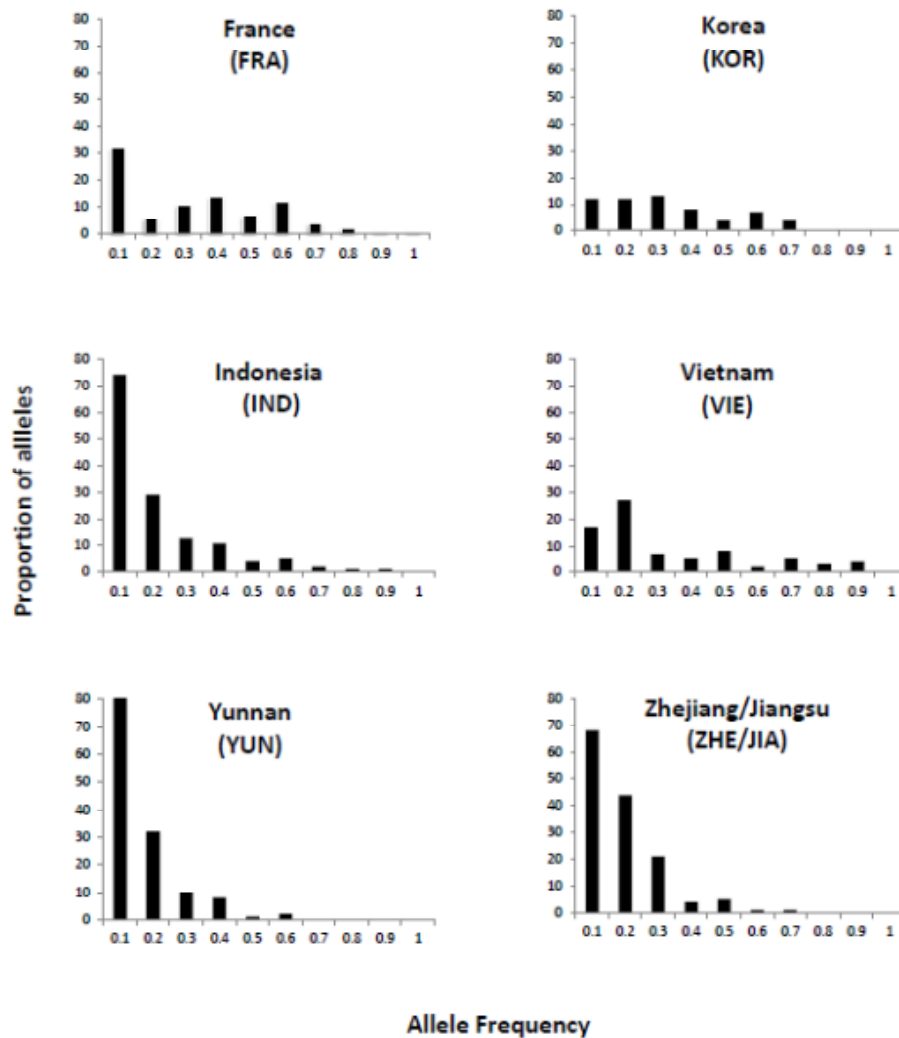


Figure 12 : Histograms of allele frequencies over all microsatellite loci for each of invasive (FRA, KOR) and native (IND, VIE, YUN, ZHE/JIA) populations studied. Bottlenecks are expected to shift the mode from low to high frequencies (i.e. from left to right).

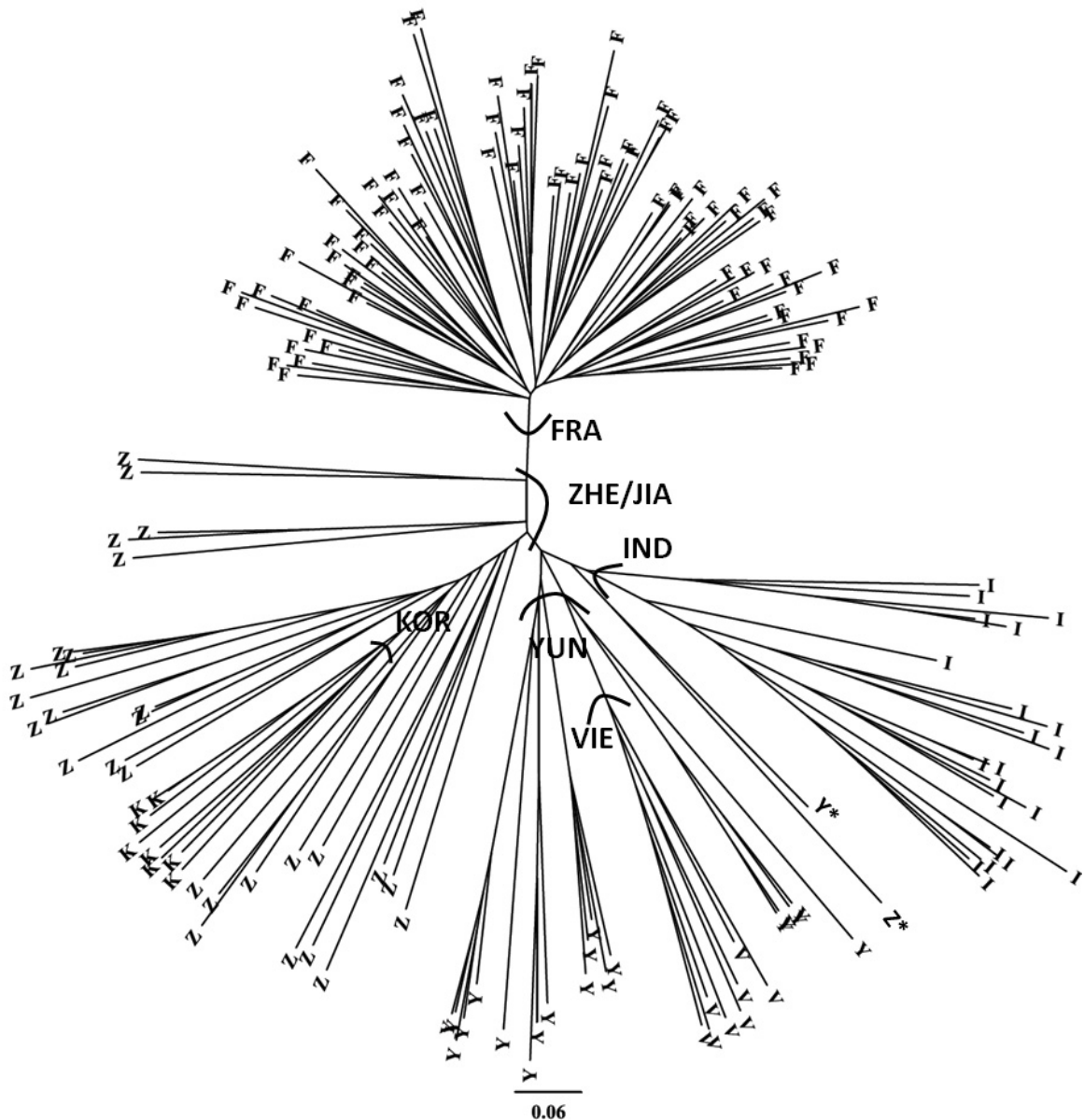


Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

Table 3 Pairwise genetic differentiation for two introduced and four native populations of *Vespa velutina*. F_{st} are indicated below the diagonal. Statistically significant values are indicated with an asterisk. The mean log assignment likelihood (-LogL) of individual from two invasive populations (France and Korea) to the four native populations are indicated above the diagonal (calculated by GeneClass 2.0. Piry *et al.* 2004). Invasive populations are in bold type.

	FRA	KOR	ZHE/JIA	YUN	VIE	IND
FRA	0	-	0.7368	0.0112	0.0000	0.0005
KOR	0.3298*	0	0.5702	0.0027	0.0000	0.0000
ZHE	0.2087*	0.0887*	0	-	-	-
YUN	0.2274*	0.1620*	0.0784*	0	-	-
VIE	0.3649*	0.3233*	0.2121*	0.1937*	0	
IND	0.3244*	0.2385*	0.1534*	0.1481*	0.3053*	0

Figure 13 : Neighbor-joining tree of individuals based on microsatellite data. Each tip represents a single individual. F, Z, K, I, Y and V stand for France, Zhejiang/Jiangsu, Korea, Indonesia, Yunnan and Vietnam respectively and indicate the populations of origin. Individuals that do not group with individuals of the same origin are marked with an asterisk (*). The tree was constructed using the program Populations 1.2.28. The distance matrix was computed using shared allele distances (DAS; Jin & Chakraborty 1993).



Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

Table 4 Number of queens and mates per colony in the French population inferred from the worker offspring data using MateSoft 1.0.

Colony	N	N° locus	Nq	Nm
V0809	50	10	1	1
V0813	61	8	1	4
V0825b	68	11	1	3
V0830	41	12	1	8
V0907	63	12	1	3
V0912	13	8	1	5
V0921	45	8	1	4
V0926	83	12	1	12
V0927	36	12	1	5

N Number of analysed samples per colony ; **N° locus** Number of analysed locus per individual; **Nq**. number of queen per colony; **Nm** number of mates per nest.

Figure 15 : Posterior distribution of important demographic parameters.

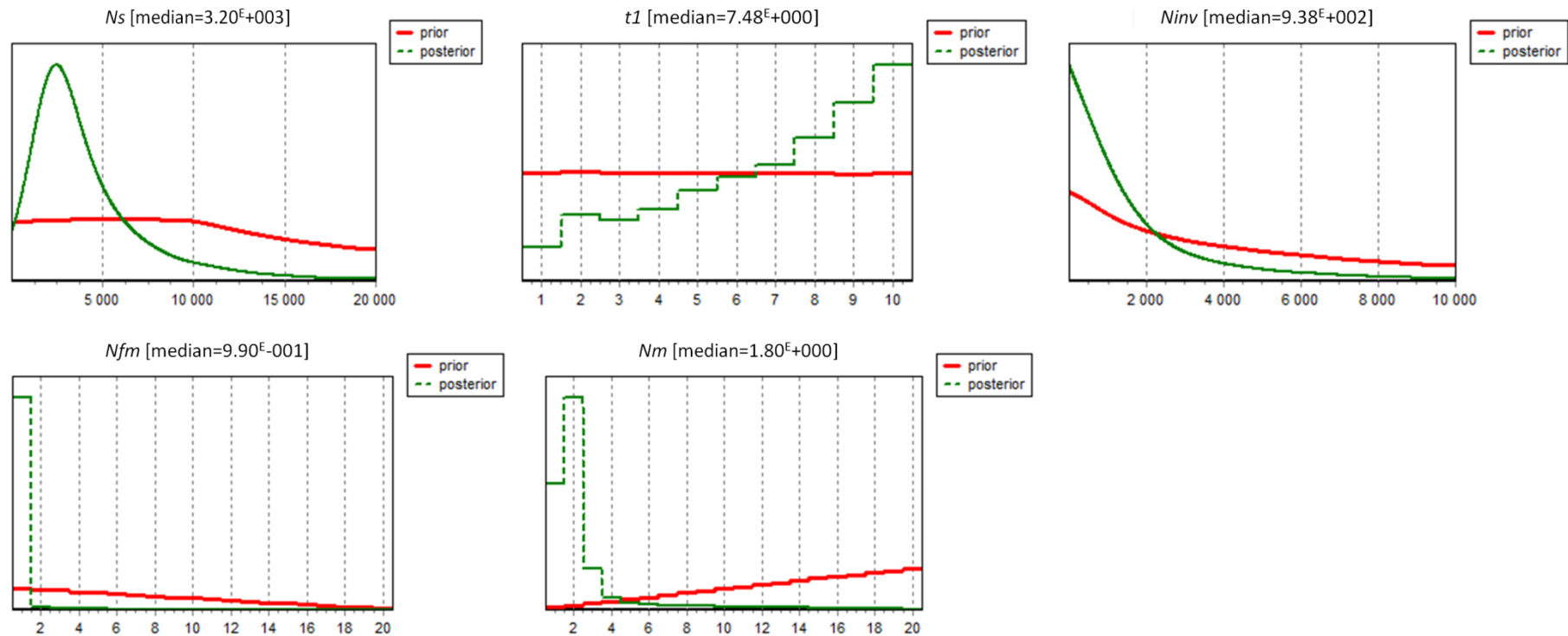


Table 5 Posterior probabilities of the competing scenarios of invasion and components of the type II error of the selected scenario in the first ABC analysis. The compared scenarios are detailed in Fig. 2. Type II error components correspond to the proportions of cases in which the selected scenario is chosen when it is not the true one. The probabilities and confidence interval (CI) shown in bold are those of the selected scenario.

Scenario considered	Source	France		Korea	
		Posterior probability	Type II error	Posterior probability	Type II error
Scenario 1	P1 = Zhejiang/Jiangsu	0.6624 [0.5682, 0.7565]	NA	0.8954 [0.8518, 0.9390]	NA
Scenario 2	P2 = Yunnan	0.0022 [0.0007, 0.0037]	0	0.0001 [0.0000, 0.0002]	0
Scenario 3	P3 = Vietnam	0.0025 [0.0000, 0.0057]	0	0.0000 [0.0000, 0.0000]	0
Scenario 4	P4 = Indonesia	0.0000 [0.0000, 0.0000]	0	0.0000 [0.0000, 0.0000]	0
Scenario 5	P5 = Unsampled	0.0118 [0.0050, 0.0187]	0.01	0.0011 [0.0003, 0.0020]	0
Scenario 6	P1+P2	0.0799 [0.0432, 0.1166]	0.03	0.0588 [0.0270, 0.0906]	0.06
Scenario 7	P1+P3	0.0967 [0.0427, 0.1506]	0.05	0.0068 [0.0019, 0.0117]	0.05
Scenario 8	P1+P4	0.0030 [0.0009, 0.0051]	0.05	0.0186 [0.0064, 0.0309]	0.05
Scenario 9	P1+Pg	0.1233 [0.0734, 0.1733]	0.11	0.0188 [0.0091, 0.0285]	0.11
Scenario 10	P2+P3	0.0017 [0.0003, 0.0031]	0.01	0.0000 [0.0000, 0.0000]	0
Scenario 11	P2+P4	0.0000 [0.0000, 0.0001]	0	0.0000 [0.0000, 0.0000]	0
Scenario 12	P2+Pg	0.0055 [0.0023, 0.0087]	0	0.0002 [0.0001, 0.0004]	0.01
Scenario 13	P3+P4	0.0000 [0.0000, 0.0001]	0	0.0000 [0.0000, 0.0000]	0.02
Scenario 14	P3+Pg	0.0106 [0.0028, 0.0184]	0.01	0.0000 [0.0000, 0.0000]	0
Scenario 15	P4+Pg	0.0003 [0.0000, 0.0006]	0.01	0.0001 [0.0000, 0.0002]	0
Mean		-	0.02		0.02

Table 6 Confidence in parameter estimation using Scenario 2 in the ABC analysis devoted to infer the number of introduced individuals in France.

Parameter	Bias	RMSE	50% cov	95% cov	Fact 2
<i>Ns</i>	0.268	0.982	0.482	0.938	0.880
<i>tI</i>	0.304	1.029	0.532	0.954	0.848
<i>Ninv</i>	2.986	16.472	0.506	0.944	0.730
<i>Nm</i>	0.020	0.329	0.550	0.974	0.988
<i>Nf</i>	0.085	0.388	0.478	0.944	0.984

Ns: Zhejiang/Jiangsu effective population size. *tI*: time of introduction to France. *Ninv*: French effective population size. *Nm*: effective number of haploid males that mated with introduced founders. *Nf*: effective number of introduced founders. Bias: mean relative bias. RMSE: relative mean square error. cov: coverage. Fact 2: factor 2. Strongly biased and/or imprecise estimates are highlighted in bold

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

Supplementary table S1 Primer sequences for twenty-two polymorphic microsatellite DNA marker genotyped in this study. Locus name, primer sequence, repeat motif, sample size (n), annealing temperatures (Ta), fragment size range, and number of alleles (Nall) are given for each locus.

Locus	Primer sequence (5'-3')		Repeat motif	n	T _a (°C)	N° cycles	Size (bp)	Nall
LIST2003	F: GTGTCTGCTAACTCGTGGAGA	Daly <i>et al.</i> 2002	(CT) ₁₀	119	50	45	153-193	12
	R: CGTTCATTCTCTCTTTT	Daly <i>et al.</i> 2002						
VMA-8	F: TAGACACGTACACCACTAG	Hasegawa & Takahashi. 2002	(CT) ₉	113	54	45	230-271	16
	CTGGCCAGGATATTCAGT	Hasegawa & Takahashi. 2002						
VMA-6	F: ACAGTTTCTTGATTCTGTCG	Hasegawa & Takahashi. 2002	(CT) ₁₆	115	54	45	238-242	3
	R: GATGCTATCGTCGGCATT	Hasegawa & Takahashi. 2002						
LIST2018B	F: GCTAGAGCTTTTGTAGGATTT	Daly <i>et al.</i> 2002	(GT) ₁₉	108	54	45	113-161	13
	R: GAGTGAGATAAAGAGGAAGTGA	Daly <i>et al.</i> 2002						
LIST2004B	F: AGAAAGGAAGCGGAAGAG	Daly <i>et al.</i> 2002	(CTT) ₁₃	129	50	45	120-152	10
	R: TTGTTTCGAGTTTACGACGA	Daly <i>et al.</i> 2002						
LIST2015	F: AACGATGCTGGGTATGG	Daly <i>et al.</i> 2002	(CT) ₃ ... (CT) ₆ (CT) ₂	168	50	45	167-198	13
	R: GAACGTATCTTCGTGTATCATT	Daly <i>et al.</i> 2002						
LIST2020B	F: TTCTTCTCTACCCACGAC	Daly <i>et al.</i> 2002	(CT) ₂₃ (N) ₃₇ (CA) ₁₁	149	54	45	183-217	12
	R: AGGGAGGCAAAAGGAG	Daly <i>et al.</i> 2002						
R4-26	F: CCAGGACGATCAGTATCAAGG	Arca <i>et al.</i> 2011	(CT) ₂₁	158	50	45	229-272	11
	R: TCGAAAGACAATAAAAAGAAACGA	Arca <i>et al.</i> 2011						
D2-185	F: CCGATTAAAACCGCGATGTA	Arca <i>et al.</i> 2011	(CT) ₁₈	166	50	45	208-228	9
	R: GCGGACGACAACCTTCATTA	Arca <i>et al.</i> 2011						
R4-100	F: TCGGTAATTCAGATTATTAAGTGAAAG	Arca <i>et al.</i> 2011	(AC) ₁₉ (CT) ₆	166	50	45	154-194	17
	R: CTCACGCATGATCCCTATCG	Arca <i>et al.</i> 2011						
R4-114	F: GACGGCACGTCGTGTTAAAT	Arca <i>et al.</i> 2011	(TC) ₁₅	168	50	45	122-152	11
	R: GCGAATAAAAGTTCTTCCTTCCA	Arca <i>et al.</i> 2011						
D3-15	F: CGAAGGATTTTCCTCGGACT	Arca <i>et al.</i> 2011	(TC) ₁₅	161	50	45	157-180	10
	R: TGCGTCGAAACAAATAGGTG	Arca <i>et al.</i> 2011						
R1-36	F: GGATTATACACCTTCGACCATTTT	Arca <i>et al.</i> 2011	(CT) ₁₄	170	50	30	99-119	11
	R: TCGCGAAGGGTAAAAGCAAT	Arca <i>et al.</i> 2011						
R1-75	F: TCGATTCTGTCGAAATTCACA	Arca <i>et al.</i> 2011	(AC) ₁₄	169	50	30	142-154	5
	R: TATCGGAAGGGTGAAACGAA	Arca <i>et al.</i> 2011						
R1-77	F: ACGTTCTAAGAGCCGTGCAT	Arca <i>et al.</i> 2011	(CT) ₁₅ (CTT) ₅	169	50	30	241-255	8
	R: AATTGGACAAATCCGCTCTG	Arca <i>et al.</i> 2011						
R1-80	F: CATCATCGGCACATACAAAAA	Arca <i>et al.</i> 2011	(GT) ₁₉	169	50	40	100-174	25
	R: TGGAATGAAAATTAACGAGTTT	Arca <i>et al.</i> 2011						
R4-33	F: TTGTCTCTTCGGGGAACAAT	Arca <i>et al.</i> 2011	(GA) ₂₀	152	50	30	199-225	14
	R: TGTTCGCTGAAAGAGAGAGTG	Arca <i>et al.</i> 2011						
R1-137	F: GCACCAAGGAACGAGGTATG	Arca <i>et al.</i> 2011	(GA) ₂₃	165	50	30	168-202	16
	R: TCGTCGAGATATTGTAGGGAAAA	Arca <i>et al.</i> 2011						
R1-169	F: GACGGTCGGCTGTTAGGATA	Arca <i>et al.</i> 2011	(CT) ₂₇	162	50	30	148-165	8
	R: CGAGCGCCTTCTTTAGTGAG	Arca <i>et al.</i> 2011						
D2-142	F: AATGATTTCCAACCTCAAGCGTTA	Arca <i>et al.</i> 2011	(CT) ₁₄	164	50	40	147-182	16

*Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France:
Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)*

	R: GGTACATTCGAGATAAAATGGACTA	Arca <i>et al.</i> , 2011							
R3-115	F: TGATTAGATCTTCGACGTTACACC	Arca <i>et al.</i> , 2011	(CT) ₁₆	144	50	40	140-184	15	
	R: TTTGTGTTTGCCCGTAGTCA	Arca <i>et al.</i> , 2011							
R1-158	F: GCTCCTAGACGAGGACAACC	Arca <i>et al.</i> , 2011	(CA) ₂₀ (CG) ₅	161	50	30	153-174	9	
	R: ATCGTGTTGCCTGAAGAAT	Arca <i>et al.</i> , 2011							

*Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France:
Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)*

Supplementary table S2 Matrix of pairwise F_{st} between the 6 clusters inferred from the Structure analysis in the French invasive population. Statistically significant values are in bold type.

	1	2	3	4	5	6
1	*					
2	0.078	*				
3	0.106	0.017	*			
4	0.094	0.020	0.027	*		
5	0.060	0.012	0.011	0.011	*	
6	0.092	0.042	0.019	-0.007	0.007	*

VI.5. STRUCTURE GENETIQUE DES NIDS

Les petites populations isolées, ou les populations passant par de forts goulots d'étranglement, comme dans le cas de la population française de *V. velutina*, sont souvent menacées par la consanguinité. Pour les individus de ces populations la probabilité de s'accoupler avec un partenaire apparenté est plus forte que dans les grandes populations. Les accouplements consanguins sont donc potentiellement fréquents et peuvent provoquer une augmentation du nombre d'individus homozygotes au sein de la population et induire une perte de la diversité allélique (Keller & Waller 2002). Cette augmentation de la proportion d'homozygotes détermine le phénomène dit de « dépression de consanguinité » selon lequel l'expression d'allèles récessifs délétères réduit le potentiel d'adaptation des individus (Frankham 2005).

Afin d'évaluer les capacités de reproduction du frelon en France en liaison avec la baisse de diversité génétique due à l'événement d'introduction et d'estimer la diversité que peut « porter » une femelle fécondée nous avons entrepris de caractériser génétiquement des colonies. Plus spécifiquement, l'objectif de cette étude était d'estimer le nombre de femelles reproductrices (reines) et le nombre de mâles fécondants par colonie.

Chez les hyménoptères, les individus mâles sont haploïdes et consécutivement leurs génotypes donnent donc directement accès au génotype des mères. Les génotypes diploïdes des descendants femelles permettent de connaître à la fois le génotype de mères et celui des pères. Pour chaque nid étudié, des individus femelles ainsi que des individus mâles ont donc été génotypés.

Douze colonies collectées en France à différentes périodes ont été analysées en privilégiant les nids de grande taille. La collecte et la dissection des nids ont été réalisées par l'équipe du MNHN, dans le cadre d'une étude visant à mieux connaître l'évolution des nids et à estimer le nombre total d'individus et le nombre de futures fondatrices produits par une colonie.

Notre étude a été préférentiellement menée à partir de nymphes afin d'assurer que les individus analysés étaient bien les descendants de la colonie étudiée (la dérive, à savoir la migration d'ouvrières d'un nid à l'autre, est en effet un phénomène fréquent chez les hyménoptères sociaux) (Sumner *et al.* 2007).

Pour le génotypage des nymphes, 8 (List2003; D3-15, R3-115, R4-114; D2-185; R4-100; R1-158; R1-137) des 22 locus microsatellites utilisées pour l'étude populationnelle, ont été utilisés dans un premier temps, en privilégiant les locus les plus variables. Cependant, certains marqueurs étant homozygotes et peu informatifs dans certains nids, le nombre de loci analysé a été augmenté jusqu'à 12 (R1-36; R1-75; R1-77 ; R1-80). Le **Tableau 7** résume le nombre de marqueurs utilisés par nid, le nombre d'individus étudiés ainsi que les nombre de lignées paternelles identifiées.

	Origine géographique	Femelles	Mâles	Tot.	Nb marqueurs analysés	Nb marqueurs informatifs	Nb lignées paternelles	Mâles n	2n	Mois d'échantillonnage	Effectif estimé
NID2	Gironde	7	36	43	8	7	2	0	36		
NID3	Gironde	33	11	44	8	8	6	8	3		
V08-09	Gironde	25	26	51	10	7	1	0	26	septembre	1192
V08-13	?	49	12	61	8	7	4	10	2		
V08-25b	Dordogne	42	26	68	11	5	3	25	1	octobre	1567
V08-30	Périgueux	42	0	42	12	10	8	-	-	juin	957
V08-43	Dordogne	96	16	112	12	10	5	14	2	novembre	6986
V09-26	Ile de France	44	40	84	11	11	9	5	35	septembre	1485
V09-07	Aquitaine	40	20	63	12	9	3	20	0	octobre	5300
V09-12	Dordogne	13	-	13	8	8	5	-	-	octobre	1910
V09-21	Dordogne	45	0	45	8	6	4	-	-	août	1027
V09-27	Midi-Pyrénées	19	17	36	12	8	5	0	17	décembre	4525

Tableau 7 Bilan de l'analyse des colonies de *V. velutina* en France. Les marqueurs informatifs correspondent aux marqueurs variables dans la colonie analysée. Le génotypage des mâles a permis de montrer l'existence de mâles diploïdes (2n) et haploïdes (n) dans la descendance. L'effectif estimé correspond au nombre d'individus produits dans le nid. Il est obtenu en estimant le nombre de cellules ainsi que le nombre de méconium moyen laissé dans chaque cellule (le nombre de méconium indique combien de larves ont été élevées dans la cellule).

Les génotypes de la fondatrice et des mâles fécondants ont été déduits à partir des génotypes d'ouvrières en utilisant le logiciel MateSoft 1.0 (Moilanen *et al.* 2004). Pour une bonne estimation du génotype des reines et du nombre de lignées paternelles un échantillonnage suffisant de la descendance est nécessaire (entre 36 et 98 individus diploïdes ont pu être analysés). Lorsque plusieurs génotypes alternatifs de reine étaient possibles, les génotypes des mâles haploïdes permettaient de sélectionner le génotype le plus vraisemblable. Dans certains cas cependant, du fait d'un nombre insuffisant de descendants haploïdes, il n'a pas été possible de trancher entre les génotypes alternatifs. Dans ce cas, le principe de la parcimonie a été appliqué, à savoir que le génotype maternel impliquant le plus petit nombre de mâles fécondants a été choisi.

Les analyses ont montré que pour chaque nid analysé une seule reine assure la descendance. L'étude de ces douze colonies montre que les ouvrières sont issues de

plusieurs lignées paternelles différentes (polyandrie). Le nombre moyen de mâles fécondants par reine est de 4.6 ± 2.3 . Il apparaît clairement que le nombre de lignées détectées augmente avec la taille de l'échantillonnage et le nombre de marqueurs informatifs. En effet, les différents pères ont des contributions inégales et certains ne peuvent être détectés qu'avec un effort supplémentaire de génotypage. Cependant, il existe aussi une variabilité inter-nids du nombre de mâles fécondants puisque par exemple les tailles d'échantillons et nombres de marqueurs analysés sont comparables entre les nids V08-09 et V08-13 alors que les nombres de lignées paternelles sont respectivement 1 et 4. La polyandrie est donc le cas le plus fréquent parmi les nids étudiés et le nombre de mâles fécondants peut être élevé : jusqu'à 9 mâles fécondants pour la colonie V09-26. Chaque femelle fécondée peut donc amener en terme de diversité allélique jusqu'à l'équivalent d'un génome diploïde et d'une dizaine de génomes haploïdes soit l'équivalent de 6 individus diploïdes. Ces informations ont été prises en compte pour estimer séparément l'effectif des femelles introduites et des mâles introduits (sous forme de réserve de sperme) lors de l'invasion française (Voir ARTICLE II).

Ce résultat est assez inattendu étant donné que la polyandrie est une stratégie de reproduction rare chez les Vespidae. En effet, *V. velutina* est monogyne comme la plus part des Vespidae. En revanche, son niveau de polyandrie, mesuré en fonction du nombre moyen de mâles fécondant une reine, est plus élevé que le niveau observé pour les autres espèces du genre *Vespa* étudiées et pour la majorité des Vespidae (Hughes *et al.* 2008). Par exemple, *V. crabro* et *V. mandarinia* montrent un niveau de polyandrie faible (nombre moyen de mâles fécondants la reine : 1.12 et 1.03 respectivement) et sont considérés comme des espèces polyandre facultatives. *V. ducalis*, au contraire, est une espèce strictement monoandre (**Tableau 8**).

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

Famille	Genre	Espèce	Polyandrie				Polygynie			
			Prop	Eff	mf ²	Niveau ³	ref.	Oui/non	No. Reines ⁴	ref.
Vespidae	<i>Parischnogaster</i>	<i>alternata</i>	0.02	1.02	0		[Bolton et al. 2006]	non	1	[Bolton et al. 2006]
Vespidae	<i>Parischnogaster</i>	<i>melyi</i>	0	1	0		[Fanelli et al. 2005]	non	1	[Fanelli et al. 2005]
Vespidae	<i>Liostenogaster</i>	<i>flavolineata</i>	0	1	0		[Sumner et al. 2002]	non	1	[Sumner et al. 2002]
Vespidae	<i>Eustenogaster</i>	<i>fraterna</i>	0	1	0		[Landi et al. 2003]	non	1	[Landi et al. 2003]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>annularis</i>	0.05	1.05	0		[Peters et al. 1995]	oui	?	[Reeve et al. 1991]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>bellicosus</i>	0	1	0		[Strassmann 2001]	oui	1.6	[Wenseleers & Ratnieks 2006, Hammond & Keller 2004]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>biglumis</i>	0	1	0		[Wenseleers & Ratnieks 2006, Arevalo et al. 1998]	non	1	[Wenseleers & Ratnieks 2006, Arevalo et al. 1998]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>chinensis</i>	0	1	0		[Wenseleers & Ratnieks 2006, Saigo & Tsuchida 2004]	non	1	[Wenseleers & Ratnieks 2006, Saigo & Tsuchida 2004]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>dorsalis</i>	0	1	0		[Arevalo et al. 1998]	non	1	[Wenseleers & Ratnieks 2006, Arevalo et al. 1998]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>fuscatus</i>	?	?	0		[Metcalf 1980]	oui	1.86	[Metcalf 1980]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>gallicus</i>	0	1	0		[Strassmann et al. 2003]	non	1	[Strassmann et al. 2003]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>jadwigae</i>	0	1	0		[Tsuchida 1994]	non	1	[Ito 1993]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>metricus</i>	0.18	?	1		[Metcalf & Whitt 1977]	oui	1.03	[Metcalf 1980]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>snelleni</i>	0	1	0		[Sayama & Takahashi 2005]	non	1	[Ito 1993]
Vespidae	<i>Polistes</i>	<i>versicolor</i>	0	1	0		[Page 1986]	oui	?	[Ito 1993]
Vespidae	<i>Parachartegus</i>	<i>colobopteris</i>	0	1	0		[Goodnight et al. 1996]	oui	46	[Wenseleers & Ratnieks 2006, Goodnight et al. 1996]
Vespidae	<i>Polybioides</i>	<i>tabidus</i>	0	1	0		[Henshaw et al. 2000]	oui	34	[Henshaw et al. 2000]
Vespidae	<i>Ropalidia</i>	<i>marginata</i>	?	?	0		[Crozier & Pamilo 1996]	non	1	[Crozier & Pamilo 1996]
Vespidae	<i>Ropalidia</i>	<i>revolutionalis</i>	0.01	1	0		[Henshaw & Crozier 2004]	non	1	[Henshaw & Crozier 2004]
Vespidae	<i>Parapolybia</i>	<i>indica</i>	0.14		1		[Katada et al. 2007]	non	1	[Katada et al. 2007]
Vespidae	<i>Brachygastra</i>	<i>mellifica</i>	0	1	0		[Hastings et al. 1998]	oui	398	[Hastings et al. 1998]
Vespidae	<i>Vespa</i>	<i>crabro</i>	0.20	1.12	1		[Foster et al. 2000-Foster et al. 1999]	non	1	[Foster et al. 2000-Foster et al. 1999]
Vespidae	<i>Vespa</i>	<i>ducalis</i>	0	1	0		[Takahashi et al. 2002]	non	1	[Takahashi et al. 2002]
Vespidae	<i>Vespa</i>	<i>mandarinia</i>	0.1	1.03	1		[Takahashi et al. 2004]	non	1	[Takahashi et al. 2004]
Vespidae	<i>Provespa</i>	<i>anomola</i>	0	1	0		[Foster & Ratnieks 2001]	non	1	[Matsura 1991]
Vespidae	<i>Dolichovespula</i>	<i>arenaria</i>	0.29	1.2	1		[Foster & Ratnieks 2001]	non	1	[Wenseleers & Ratnieks 2006, Foster & Ratnieks 2001]
Vespidae	<i>Dolichovespula</i>	<i>maculata</i>	0	1	0		[Foster et al. 2001]	non	1	[Foster et al. 2001]
Vespidae	<i>Dolichovespula</i>	<i>media</i>	0.18	1.08	1		[Foster et al. 2001]	non	1	[Foster et al. 2001]
Vespidae	<i>Dolichovespula</i>	<i>norvegica</i>	0.27	1.08	1		[Foster et al. 2001]	non	1	[Foster et al. 2001]
Vespidae	<i>Dolichovespula</i>	<i>saxonica</i>	0.6	1.35	1		[Foster et al. 2001]	non	1	[Foster et al. 2001]
Vespidae	<i>Dolichovespula</i>	<i>sylvestris</i>	0.36	1.15	1		[Foster & Ratnieks 2001]	non	1	[Foster et al. 2001]
Vespidae	<i>Vespula</i>	<i>atropilosa</i>	?	?	1		[19, MacDonald et al. 1974]	non	1	[Crozier & Pamilo 1996]
Vespidae	<i>Vespula</i>	<i>germanica</i>	0.86	2.35	2		[Goodisman et al. 2002]	non	1	[Goodisman et al. 2002]
Vespidae	<i>Vespula</i>	<i>maculifrons</i>	0.9	5.43	2		[Ross 1985, Ross 1986]	non	1	[Ross 1985, Ross 1986]
Vespidae	<i>Vespula</i>	<i>rufa</i>	0.67	1.5	1		[Wenseleers et al. 2005]	non	1	[Wenseleers et al. 2005]
Vespidae	<i>Vespula</i>	<i>squamosa</i>	1	2.13	2		[Ross 1986]	oui	1	[Ross 1986]
Vespidae	<i>Vespula</i>	<i>vulgaris</i>	0.94	1.9	2		[Foster & Ratnieks 2001]	non	1	[Foster & Ratnieks 2001]

Tableau 8. Polygynie et polyandrie pour les Vespidae eusociaux.

¹ Proportion de reines fécondées plus d'une fois ; ² nombre moyennes de mâles fécondants la (les) reine(s) ; ³ Niveau de la polyandrie observé pour l'espèce. 0 = monoandrie, 1 = faible polyandrie facultative (moins de 2 mâles fécondants), 2 = polyandrie modéré (2-10 mâles fécondants), 3 = extrême polyandrie (> 10 mâles fécondants). D'après Hughes *et al.* 2008

La polyandrie peut avoir joué un rôle fondamental dans le succès invasif de l'espèce. En effet plusieurs auteurs ont avancé des hypothèses mettant en avant les bénéfices que la colonie pourrait retirer de la polyandrie (Arnqvist & Nilsson 2000 ; Jennions & Petrie 2000). D'une part, la présence de différentes lignées paternelles au sein des colonies se traduit par une plus grande diversité génétique qui pourrait impliquer une plus grande résistance aux pathogènes ou aux parasites (Hamilton 1987 ; Sherman *et al.* 1988) et une plus grande flexibilité comportementale (Crozier & Page 1985). D'autre part, plusieurs accouplements permettraient de fonder des colonies plus grandes car les reines pourraient accumuler suffisamment de sperme pour assurer une descendance nombreuse (Cole 1983). Enfin, l'établissement d'une compétition post-copulatoire entre

différentes lignées spermatiques en termes de capacité à féconder les ovules permettrait d'optimiser la qualité des gènes paternels dans la descendance (Starr 1984). D'autres hypothèses suggèrent également que la polyandrie permettrait de réduire le conflit entre reines et ouvrières pour la production des mâles (Moritz 1985) et les effets néfastes du fardeau de mâles diploïdes (Page 1986) qui peut affecter les petites populations.

En effet, une forte fréquence de mâles diploïdes a pu être mise en évidence grâce à au génotypage des individus des colonies de la lignée envahissante (les colonnes mâles n et 2n du **tableau 7** indiquent respectivement le nombre de mâles haploïdes et diploïdes observés dans chaque nid).

Des mâles diploïdes ont été observés dans d'autres espèces d'hyménoptères et sont la plupart du temps liés à un déterminisme du sexe basé sur un unique gène (sl-CSD : pour single-locus Complementary Sex Determination) (Cook & Crozier, 1995). En effet, pour plus d'une soixantaine d'espèces d'hyménoptères, le déterminisme du sexe dépend de la composition allélique à un seul locus, le sl-CSD (Heimpel & de Boer, 2008). Avec ce système, les œufs non fécondés se développent en mâles haploïdes, qui sont hémizygotes au locus CSD. Au contraire, les œufs fécondés donnent des femelles diploïdes s'ils sont hétérozygotes au locus CSD et des mâles diploïdes s'ils sont homozygotes pour ce locus (**Figure 16**).

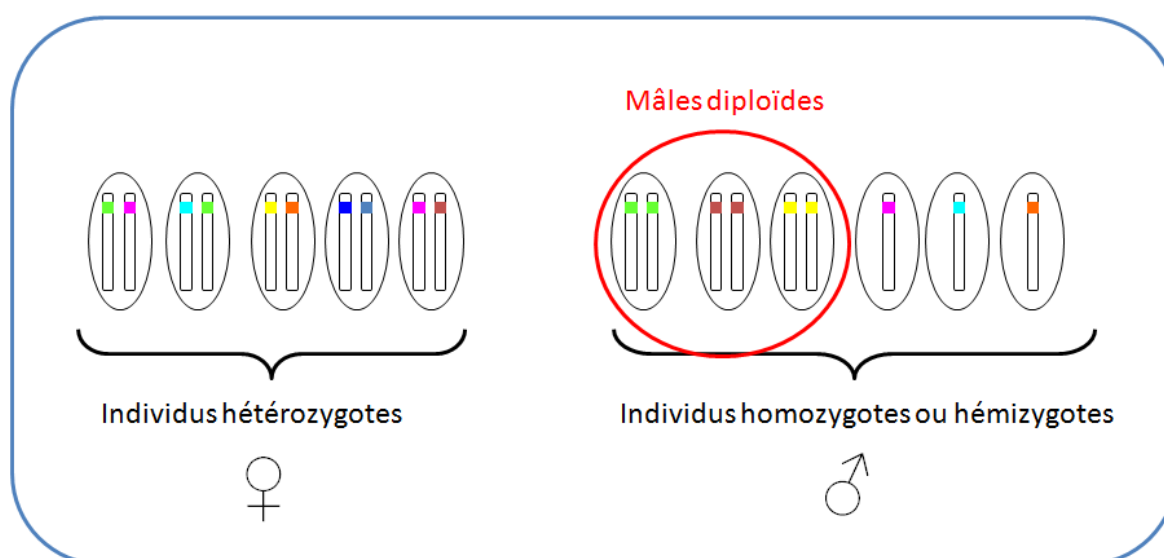


Figure 16. Système de déterminisme du sexe sl-CSD (single-locus Complementary Sex Determination).

Les mâles diploïdes étant toujours homozygotes au locus CSD, leur apparition est favorisée par la consanguinité (Cook & Crozier, 1995). Ces mâles sont stériles dans de nombreuses espèces. Dans d'autres cas, ils produisent des gamètes diploïdes conduisant à la formation de femelles triploïdes stériles (Krieger *et al.* 1999). Les mâles diploïdes constituent donc généralement un fardeau pour la population en raison du coût énergétique que leur élevage occasionne. Ils peuvent conduire les populations dans un vortex d'extinction : baisse d'effectif → baisse d'hétérozygotie → augmentation de la proportion de mâles diploïdes → baisse du taux d'accroissement → baisse d'effectif (Zayed & Packer 2005).

La présence de ces mâles diploïdes à une fréquence élevée dans les populations françaises pourrait donc résulter de la baisse de diversité liée à l'introduction d'un petit nombre d'individus. Les résultats présentés ici à ce sujet sont encore très préliminaires. Cependant, les effectifs estimés des colonies (dernière colonne du tableau 7) ne renforcent pas l'idée qu'une forte fréquence de mâles diploïdes freinerait l'expansion des colonies. En effet, les colonies présentant une forte fréquence de mâles diploïdes ne semblent pas avoir une croissance ralentie par rapport aux autres, compte tenu du mois pendant lequel le nid a été échantillonné. L'incidence des mâles diploïdes sur la croissance des colonies reste à préciser à partir d'un échantillon plus large et d'une meilleure estimation de leur fréquence dans la colonie.

PARTIE II

Impact de Vespa velutina sur l'abeille domestique Apis mellifera

VII. IMPACT DU FRELON ASIATIQUE SUR UNE ESPECE PROIE : L'ABEILLE DOMESTIQUE *APIS MELLIFERA*

Les objectifs de l'étude sont 1) de mieux comprendre si *Apis mellifera* défend ses colonies contre le nouveau prédateur *V. velutina* et quels sont les comportements mis en jeu dans cette défense et 2) de déterminer l'impact de cette prédation sur l'activité des abeilles.

VII.1. ETUDE DU COMPORTEMENT DE DEFENSE DE L'ABEILLE DOMESTIQUE *A. MELLIFERA*

Des travaux antérieurs ont décrit plusieurs stratégies de défense des abeilles du genre *Apis* contre les frelons. Par exemple, l'abeille japonaise *Apis cerana japonica* est capable de tuer son ennemi naturel, le frelon *Vespa mandarinia* par la formation d'une boule d'abeilles ouvrières et par la production de chaleur autour du frelon (« thermo-balling »). La température à l'intérieur de la boule monte jusqu'à 47 °C, ce qui est létal pour le frelon (température létale : 45±1°C), mais pas pour les abeilles (température létale 49±1°C) (Ono *et al.* 1995). Cette stratégie peut être aussi précédée d'un comportement de vibration des ailes avec agitation de l'abdomen (*shimmering*) à des fins de dissuasion (Butler 1974).

Un autre exemple de comportement défensif est celui de l'abeille *Apis mellifera cypria* à Chypre. Papachristoforou *et al.* (2007) ont montré que l'abeille chypriote tue le frelon autochtone *Vespa orientalis* par asphyxie (« asphyxia-balling ») : lorsqu'un frelon s'approche de l'entrée de la ruche ou essaie d'y pénétrer, un grand nombre de gardiennes (entre 150 et 300) l'entourent en formant une boule. Les abeilles bloquent efficacement le mouvement des segments abdominaux (tergites), limitant ainsi le fonctionnement du système respiratoire : les tergites ne s'ouvrent plus, l'air ne rentre plus par les orifices respiratoires (stigmates) et le frelon, ne pouvant plus respirer, meurt (Papachristoforou *et al.* 2007). Lors de la confrontation avec leur prédateur les abeilles chypriotes produisent également des sons de haute fréquence qui pourraient agir comme signal d'alerte pour leurs congénères (Papachristoforou *et al.* 2008). De plus, certaines colonies construisent des murs de propolis pour empêcher le frelon d'accéder à la ruche (Papachristoforou *et al.* 2011). (**Figure 17**).

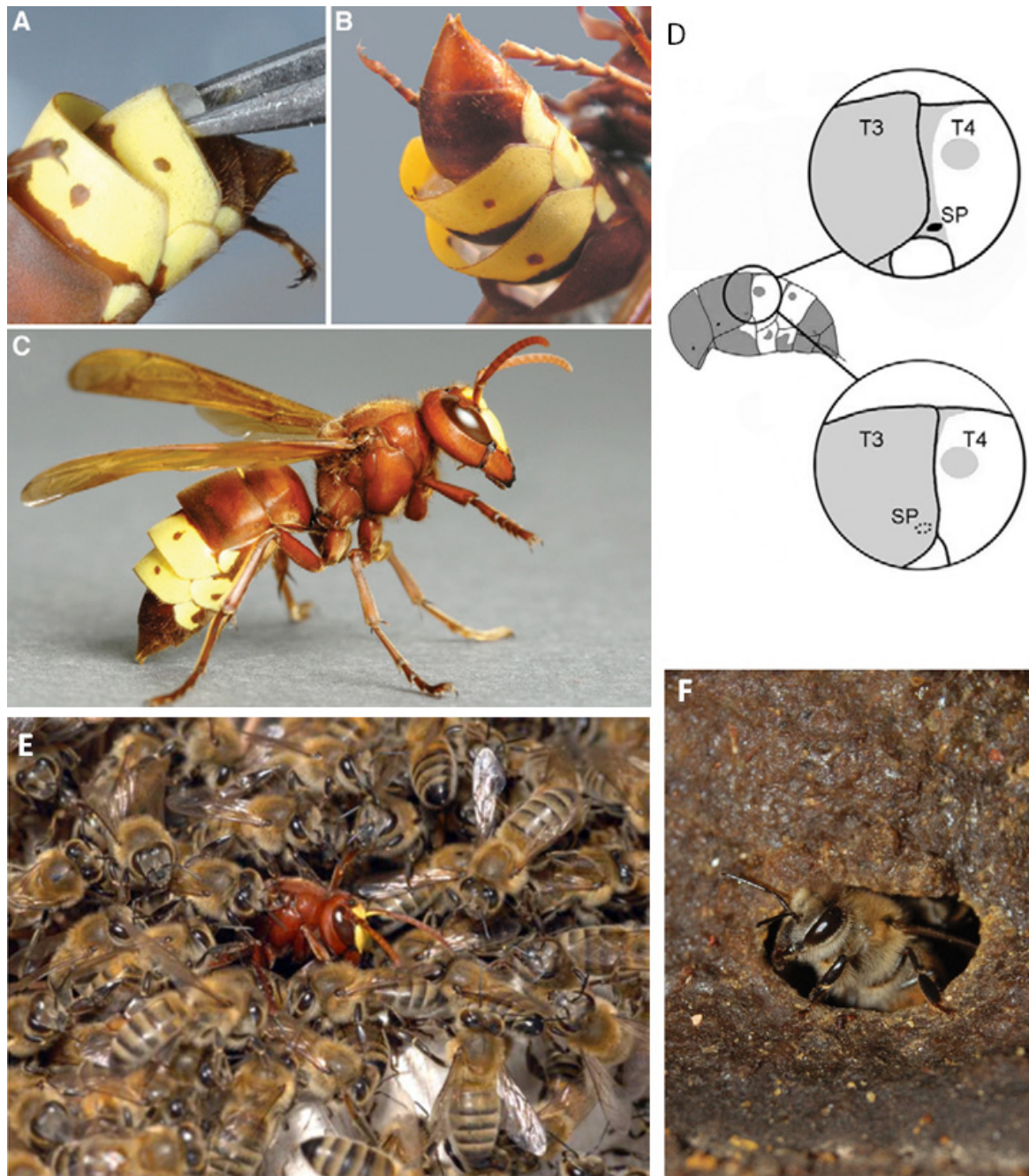


Figure 17. Stratégie de défense de l'abeille chypriote contre l'espèce locale de frelon *V. orientalis*. A-E : Expérimentation démontrant l'asphyxie du frelon par les abeilles. (« asphyxia-balling »). Des petites cales de plastique ont été introduites entre les tergites (A-C). . Ces cales évitent l'obstruction des orifices respiratoires (D, SP, spiracles). Dans ce cas le frelon survit lorsque les abeilles forment une boule autour de lui (E). Certaines colonies de *A. m. cypria* forment un mur de propolis à l'entrée de la ruche (F). La taille des orifices permet le passage des abeilles mais pas du frelon . D'après Papachristoforou *et al.* 2007 et Papachristoforou *et al.* 2011.

L'abeille italienne *Apis mellifera ligustica* peut également former une boule contre son prédateur, le frelon d'Europe *V. crabro* (Baracchi *et al.*, 2010). Ce comportement a pour effet d'élever la température du frelon, ce qui pourrait être la cause de sa mort, puisque sa température létale est d'environ 44,2°C. Mais l'influence d'autres facteurs, tels que l'asphyxie n'est pas à exclure.

L'abeille européenne, *A. mellifera*, introduite en Asie, doit faire face à plusieurs espèces de frelons. Elle semble incapable de défendre ses colonies contre les attaques de l'espèce de frelon *V. mandarinia* (Matsuura & Yamane, 1990). Par contre, elle semble capable de réaliser un comportement défensif de « balling » contre *V. velutina* en Chine. Ce comportement est toutefois moins efficace que celui réalisé par l'espèce *Apis cerana* (Ken *et al.* 2005). La réponse de cette dernière aux attaques de *V. velutina* est présentée dans la **Figure 18**.

En France, nous avons étudié le comportement de l'abeille domestique face aux attaques du frelon invasif *V. velutina* et estimé ses capacités de défense. Pour cela, nous avons essayé de répondre à 2 questions principales :

1. *L'abeille présente-t-elle un comportement de « balling » contre son nouveau prédateur V. velutina ?*
2. *Est-elle capable de tuer le frelon ?*

Afin de répondre à ces questions, nous avons conduit des observations du comportement de défense des abeilles en utilisant des expérimentations de terrain en conditions semi-contrôlées. L'expérience consiste à attacher un frelon à un fil de nylon et à l'approcher de la ruche, en observant la réponse des abeilles. Au total 95 colonies réparties dans 8 ruchers ont été étudiées (**Figure 19**).

L'approche du frelon a induit dans la plupart des cas une réaction. D'une part l'activité diminue dans la minute qui suit la présentation du frelon avant de revenir à son niveau initial. D'autre part, le nombre d'abeilles présentes sur la planche d'envol s'accroît, les abeilles formant parfois un véritable tapis qui gagne également les parois de la colonie. Le nombre d'abeilles recrutées pour ce comportement de défense atteint son maximum au bout de 2 à 5 minutes après la présentation du frelon. En revanche, la formation d'une boule autour d'un frelon qui passe à proximité des abeilles ne semble pas

réellement adoptée comme stratégie de défense chez les abeilles présentes en France, bien que cette méthode de lutte s'avère efficace dans les cas décrits dans la littérature chez d'autres sous-espèces d'*A. mellifera* ou chez *A. cerana* (cf. les références citées plus haut). Les abeilles que nous avons analysées ne sont pas capables de quitter spontanément la ruche pour attaquer le frelon qui passe à proximité et l'emporter vers la planche d'envol pour former une boule autour de lui. Elles n'ont été capables de former une boule que lorsque le frelon a été mis artificiellement à leur contact sur la planche d'envol. Dans nos conditions expérimentales, très peu de frelons ont été tués par les abeilles.

Néanmoins nous avons souhaité tester si les abeilles étaient capables de tuer le frelon dans la mesure où elles avaient la possibilité de l'entourer pendant une période suffisamment longue. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une autre expérience : un frelon (toujours attaché à un fil) a été introduit à l'intérieur d'une ruche. Le temps mis par les abeilles pour, éventuellement, tuer le frelon a été mesuré ainsi que l'évolution de la température du frelon. Les expérimentations ont été réalisées sur le site de l'INRA de Bordeaux, en collaboration avec nos collègues Denis Thiery, Karine Monceau et Olivier Bonnard.

Ces expériences ont montré que tous les frelons introduits à l'intérieur d'une colonie pendant au moins une heure mourraient. D'autre part, la température maximale produite autour du frelon était comprise entre 40.1°C et 45.1°C.

Afin d'évaluer la température létale du frelon, nous avons conduit une expérience dans un incubateur. Nous avons fait varier la température, selon une progression temporelle comparable à celle observée dans les ruches lors de l'expérimentation précédente. La température qui s'est avérée être létale pour le frelon est de 45°C.

Nous pouvons donc conclure que la température produite par les abeilles pourrait être suffisante pour tuer le frelon *V. velutina*. Cependant, nous n'avons pu tester et donc exclure l'influence d'autres facteurs tels que l'asphyxie, par exemple.

En conclusion, la capacité de défense des abeilles en France contre le frelon invasif semble très limitée. Elles sont apparemment incapables d'éliminer un grand nombre de frelons, et notamment d'adopter un comportement de « balling » efficace (absence de

formation de boules ou boules constituées d'un faible nombre d'abeilles). Toutefois, les abeilles se répartissent parfois en grand nombre sur la planche d'envol, allant même jusqu'à s'étaler sur la paroi frontale de la ruche, formant un « tapis » d'abeilles (« bee carpet »). Ce grand nombre d'abeilles bouche l'entrée de la ruche, et empêche l'entrée du frelon. Il pourrait également exercer sur les frelons un certain effet dissuasif, comme le comportement de shimmering décrit par ailleurs (Tan 2007, 2010 ; Kastberger *et al.* 2011).

Tous ces résultats sont détaillés dans l'article 3, actuellement en préparation en vue d'une soumission à Naturwissenschaften.



Figure 18. Comportement de défense de l'abeille asiatique *A. cerana* contre *V. velutina* en Asie. A-E : lorsque le frelon s'approche d'une ruche, les abeilles l'entourent en formant une boule. (Tan *et al.* 2007, Villemant *et al.* 2008). Photos : Q. Rome. F : comportement de vibration des ailes avec agitation de l'abdomen (*shimmering*)(Tan *et al.* 2010).



Figure 19. Principales étapes de l'expérimentation en conditions semi-contrôlées. A : mise en place des caméras. B : le frelon est endormi au gaz carbonique et fixé à l'extrémité d'un fil de nylon. C : après un temps de reprise d'environ 15 minutes le frelon est libre de voler dans un rayon de 10 cm. D : le frelon est posé sur la planche d'envol. E : un grand nombre d'abeilles forme une grappe sur la planche d'envol. F et G : formation d'une boule d'une trentaine d'abeilles et de 3 abeilles.

ARTICLE 3: INEFFECTIVE DEFENSE STRATEGY OF *APIS MELLIFERA* IN FRANCE AGAINST THE NEW INVASIVE HORNET *VESPA VELUTINA*

Mariangela Arca^{1,2}; Alexandros Papachristoforou¹; Florence Mougél¹; Agnès Rortais¹; Karine Monceau³; Olivier Bonnard³; Pascal Tardy⁴; Denis Thiery³; Jean-François Silvain²; Gérard Arnold¹

¹ CNRS, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 91198 – Gif-sur-Yvette cedex, France and Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay cedex, France

² Unité de Recherche IRD 072, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 91198 – Gif-sur-Yvette cedex, France and Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay cedex, France

³UMR INRA-ENITAB en Santé Végétale (1065), Centre de Recherches de Bordeaux, B.P. 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

⁴ Laboratoire IXL-UMR 5818 CNRS, ENSEIRB-Université Bordeaux 1, 351, Cours de la Libération, F33405 Talence Cedex, France

Running title: Defensive behavior of *Apis mellifera* against *Vespa velutina*.

Keywords: Yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina*, invasive species, defensive behavior, *Apis mellifera*, predation.

Corresponding author: Mariangela Arca, Laboratoire Evolution, Génome et Spéciation, bâtiment 13, Campus CNRS Avenue de la Terrasse 91190 Gif-sur-Yvette, France, fax number: 0033 1 69 82 37 36, mariangela.arca@legs.cnrs-gif.fr

Abstract

In this study we investigated the prey-predator interactions between *Apis mellifera* and *Vespa velutina* to determine the chance of success of honeybees to defend their colonies against their new predator, the yellow-legged hornet which invaded Europe eight years ago. Experiments were conducted in South-West of France, the point of entry of the hornet in Europe, under natural and semi-controlled field conditions. A total of eight apiaries and 95 colonies presenting low and high levels of predation were investigated. Observations were made on hornet predatory behavior and on collective response of colonies under attack. The results showed that the defensive strategy used by *A. mellifera* is ineffective, unlike in other regions of Europe and the world, such as Cyprus and Asia, where honeybees have co-evolved with their natural predator (*Vespa* spp.).

Introduction

Many species of Vespidae are serious enemies of honeybees and cause considerable damages to honeybee colonies (Morse 1978; Mishra *et al.* 1989; Abrol 1994) where they can find the best combination of proteins (bees and larvae) and carbohydrates (nectar and honey) (Matsuura and Yamane 1990). Several studies were conducted on interactions between honeybees and their predatory hornets to explain the dynamics of the collective defensive behavior (i.e. at the colony-level).

In Japan, the native honeybee *Apis cerana* developed a defensive strategy called «thermo-balling» to kill its natural enemy, the Asian giant hornet *Vespa mandarinia* (Ono *et al.* 1995). In response to predatory attacks, Japanese honeybees form a dense cluster around the hornet, usually involving around 180-300 honeybees, and then generate heat by buzzing. The temperature inside the ball reaches 47°C, that is lethal for hornets but not for honeybees (the species' thermal limits are about 45±1°C and 49±1°C, respectively) (Ono *et al.* 1995). However, research on the thermo-balling phenomenon revealed that heat is not sufficient to induce the death of an engulfed hornet; the presence of high levels of CO₂ concentration is co-acting with temperature to kill *V. mandarinia* inside balls of *A. cerana* workers (Sugahara and Sakamoto 2009).

In Cyprus, the defensive behavior of the honeybee *Apis mellifera cypria* against its natural predator *Vespa orientalis* consists also in a balling behavior but this strategy is different to the thermo-balling reported for Asian honeybees (Papachristoforou *et al.* 2007). *Vespa orientalis* is well adapted to high temperatures. It occurs in dry and hot environments, from South and central Asia to the Arabian Peninsula, up to northern and eastern Africa (from Egypt to Somalia) and to the Mediterranean basin (Southern Italy, Malta, Albania, Greece, Cyprus) (Archer 1998). The lethal thermal limit in *V. orientalis* is higher than in *V. mandarinia* (50.6±0.6°C versus 45±1°C) but similar to the thermal limit of honeybees (50.5±0.1°C). Therefore, Cyprian honeybees cannot kill hornets by thermo-balling. Instead, they adopt another strategy, namely “asphyxia-balling” (Papachristoforou *et al.* 2007), by blocking efficiently the movement of the abdominal segments (tergites) of the trapped hornet; an action that limits the functioning of the predator's respiratory system.

In Italy, the native honeybee *A. m. ligustica* exhibits the balling behavior against its natural predator, *V. crabro* (Baracchi *et al.* 2010). This behavior leads to an increase in the body temperature of the hornet. Since the lethal temperature of the hornet is $44.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$, it is assumed that the cause of the predator's death is temperature. However, the influence of other factors such as asphyxia cannot be excluded and need to be further investigated (Baracchi *et al.* 2010).

Among the possible causes of death of hornets caused by honeybees (i.e. whether related to temperature and/or CO₂), it appears that the key element to consider is the ability of honeybees to form a successful ball to engulf properly hornets.

Honeybee colonies can also defend themselves without physical contact with their enemies through intimidation behaviors or physical barriers. Examples include colony aggregation (Paar *et al.* 2004; Kastberger *et al.* 2008; Papachristoforou *et al.* 2008) called "bee-carpet behavior" (Baracchi *et al.* 2010; Papachristoforou *et al.* 2011), synchronized abdominal shaking known as "shimmering" (Butler 1974), alarm sounds emission defined as "hissing" (Papachristoforou *et al.* 2008), and the building of walls of propolis to prevent hornets from getting into the hive (Papachristoforou *et al.* 2011).

All these successful defensive strategies developed by honeybees to defend their colonies against hornets' attacks have been ascribed to an evolutionary response to predation pressure and environmental factors (Ono *et al.* 1995; Papachristoforou *et al.* 2007; Tan *et al.* 2007). In these studies, each prey (honeybees) and its associated predator (hornet) were found to be long term sympatric species within the studied geographic area.

The recent establishment of the invasive yellow-legged hornet *Vespa velutina* in Europe raised many questions about its potential impact on local honeybees, *Apis mellifera*, and consequently on the capacities of the honeybees to defend themselves against this new predator.

Vespa velutina originates from the north of India and China, where it is widespread. It is distributed in areas presenting a wide annual temperature range. In north India, in the Kashmir region, and in China, *V. velutina* is considered as a dreadful enemy of honeybees colonies (Shah & Shah 1991; Abrol 1994; Ken *et al.* 2005; Tan *et al.* 2007) and attacks

can cause up to 30% of colony losses (Sakagami and Akahira 1960; Ken *et al.* 2005). *Vespa velutina* was discovered for the first time in France in 2004 and has rapidly become a problem for the French beekeepers. As of 2011, it was estimated to be present on an area of about 270,000 km² in France (Rome *et al.* 2012) and it recently extended in the north of Spain (Castro and Pagola-Cardé 2010; López *et al.* 2011), in Portugal (Grosso-Silva and Maia 2012) and Belgium (J. D'Haeseleer, personal comm).

The high economic losses, due to the hornet's predation on honeybees, the induced colony collapse and reduction of honey production, forced some beekeepers to abandon their business (Villemant *et al.* 2011). It is clear that the expansion of the hornet represents a large cost not only for the beekeeping sector but also for the environment, as pollination depends strongly on honeybees (Gallai *et al.* 2009).

Like many other invasive species, the population levels of *V. velutina* in its natural range of distribution are controlled by several environmental factors (e.g. predation and competition). However, in the area of introduction, the role of such factors on the population dynamics of *V. velutina* has never been investigated. Due to the size of their colonies, at least three times more populous than those of the European hornet *V. crabro*, *V. velutina* exerts a stronger predation pressure on the apiaries than the native hornet (Villemant *et al.* 2006).

In China, the European honeybee *A. mellifera* which has been imported seems to be able to defend its colonies against attacks of *V. velutina* (Ken *et al.* 2005, Villemant 2008, Tan *et al.* 2010). However, the *A. mellifera* "balling" defensive behavior is less effective than the one developed by the native species *A. cerana* (Ono *et al.* 1987; Ken *et al.* 2005).

In France, the defensive behavior of *A. mellifera* against hornets is poorly known. The objective of this study is to better understand how *A. mellifera* defends its colonies against the new predator *V. velutina* by addressing the following questions: i) How do the two species, *A. mellifera* and *V. velutina*, interact? ii) Can honeybees develop a "balling" behavior against the new predator? iii) Are honeybees able to kill the hornet? iv) Can honeybees defend their colonies with some alternative strategies? To answer these questions we have conducted observations on the defensive behavior of honeybees under natural and semi-controlled field conditions.

Material and Methods

Apiaries description

Observations were carried out in August and October 2008 and in August and September 2010 (Table 9), when the hornet population is at its maximum level. Eight apiaries and 95 colonies were selected in an area of 12,000 km² in south-west of France (Fig. 20). These apiaries were selected to present contrasted levels of predation (i.e. measured as either low, when no natural attack was spotted on the tested colonies during the experiment, or high, when the tested colonies were naturally attacked during the experiment) and exposure duration (i.e. corresponding to the number of years since the hornet's activity was first detected at the apiary) (Table 9).

Simulated hornet attacks

The defensive behavior of *A. mellifera* was observed during both natural conditions and simulated hornet attacks and it was conducted as described by Papachristoforou *et al.* (2007). Hornets were collected *in situ*, anaesthetized and attached to a nylon thread. Once the hornets had fully recovered, they were brought to the beehive flight board and exposed to colonies guards. Hornets were free to move and flight within the restricted range of 10 cm. The test duration was 5 min and consisted of 20 steps of 15 sec: T₀ no hornet (observations in natural conditions); T₁ hornet at 15 cm from the hive entrance (observations before hornet attacks); T₂-T₂₀ hornet on the hive's flight board (observations after hornet attacks). The procedure was video-monitored by a Sony digital camera, placed at 50 cm from the hive's flight board.

The recorded sequences were analyzed in slow motion (1/5 of normal speed) by interactive event recording software (LabWatcher, ViewPoint, France) in order to count the number of honeybees leaving the hive's flight board. The activity was only measured during the first minute following the introduction of the hornet in front of the flight board corresponding to the observed time required for honeybees to respond.

Video recordings at time T₀ (before attack), T₁₀ (after 2 min 30 sec) and T₂₀ (after 5 min) were transformed in pictures capturing screenshots in Windows 7. Pictures were analyzed with ImageJ software and the number of honeybees on flight boards during attacks was counted. Measurements were conducted at T₀, T₁₀ and T₂₀ because the

guarding behavior increased during at least 2 min and sometimes reached its maximum value only after 5 min. The ability to form a ball around the hornet was evaluated by the number of honeybees in the ball and classified in an ordinal value ranging from 0 – no ball – to 4 – more than 30 honeybees in the ball.

The survival status of hornets at the end of the experiment and the presence/absence of stings was also recorded on site. Qualitative observations of prey-predator interactions under natural conditions were also evaluated through direct, visual observation.

Statistical analysis for simulated hornet attacks experiment

To appreciate the ability of honeybee to react and defend their colonies against the yellow-legged hornet, two behavioral variables were assessed: i) the foraging flight activity of the colony (measured by the number of honeybees leaving the nest before and during the hornet introduction) and ii) the “carpet behavior” (measured by the number of honeybees on the flight board or on the vertical walls near the entrance before and during the hornet introduction).

Eight parameters were used as explanatory variables: 1) the “apiary” in which the experiment occurred, 2) the “colony” (considered as different repeated experiments from an apiary), 3) the “year” when the experiment was performed (that is 2008 or 2010 encoded as a qualitative variable), 4) the “month” of the experiment (August, September or October), 5) the “exposure level” considered low, when no natural attack was spotted on the tested colonies during the experiment, or high, when the tested colonies were naturally attacked during the experiment 6) the “duration of exposure” to hornets (that is the delay between the experiment and the first exposure to hornets expressed in years), 7) the “test order” indicating by an ordinal qualitative variable the order in which colonies from a an apiary were tested and 8) the “time” since the introduction of the hornet to the tested colony (encoded as T_0 before the presentation and then increasing by one unit every 15 sec).

The activity of the colony and the “carpet behavior” correspond to counting variables and were modeled as Poisson variables in a generalized linear model using R Statistical software (R Development Core Team, 2010). The eight variables were introduced as linear predictors for both variables independently. The significance of the

contribution of these predictors was then tested through a stepwise selection model. Furthermore, the influence of each predictor in the final model (selected by the stepwise process) was tested comparing the final model with the same model minus the tested predictor. Comparisons were tested in an analysis of deviance computed by chi-square tests. As both models showed an over-dispersion, the final model and the analyses of deviance were performed a second time using a quasipoisson model to confirm or infirm the significant contribution of the selected predictors.

Survival of V. velutina inside the hive

To test if the honeybees were able to form a ball around the hornet and to kill it, a hornet prepared as described above was introduced into a hive. In total, seven colonies (B1-B7) and 55 hornets were studied in the INRA apiary making a total of 55 trials (Table 10). In order to measure the time taken by honeybees to eventually kill the hornet, the experiment was repeated with variable durations: 15 min, 20 min, 30 min and 1 h (see Table 2 for experiment duration and number of replications for each studied colony).

At the same time, the temperature variation inside the hive was recorded by two 2 mm micro-probes connected to a highly accurate ($\pm 1^\circ\text{C}$) digital thermometer (YCT RS-232 thermometer). The first one was attached on the hornet's thorax and the second one located at about 15 cm from the hornet. The experiment was repeated five times for each of the seven colonies. For the first three repetitions the experiment duration was 15 min while for the last two it was one hour. The temperature was recorded every 30 sec (means and standard deviations of the maximum temperature recorded are reported in Table 10).

For the seven tested colonies, the approximate population strength was assessed by determining the number of honeybees covering each side of the frames.

Lethal temperature of V. velutina

To estimate the lethal temperature of *V. velutina*, an experiment was conducted in an incubator. The incubator temperature varied according to a temporal progression similar to the temperature found inside the hives in the previous experiment, up to a maximum of 45°C . Hornets were captured on site, at the INRA apiary, and anaesthetized

as described by Papachristoforou *et al.* (2007). Each hornet was then transferred into a ventilated transparent cage and placed in the incubator.

Four experiments were conducted with 6, 9, 5 and 7 hornets, respectively, making a total of 27 hornets (Table 11).

Results

Observations of the natural interactions between honeybees and hornets

During the behavioral experiments conducted in August-October 2008 and August-September 2010, interactions between honeybees and hornets were observed in natural conditions. The general trends of the species' behavior were qualitatively described.

When honeybees were preyed by the yellow-legged hornet, they tended to reduce their foraging activity and even stop it when hornets were too abundant. In response to the hornet presence around the hive, colonies adopted different strategies. In some colonies, a large number of honeybees gathered on the flight board and on the vertical walls near the entrance to form a cluster or a "bee-carpet" (Fig. 21). In other colonies, honeybees on the flight board exhibited a coordinated behavior with individuals clinging together in groups and following the hornet's movements by turning their body in its direction. No shimmering was observed in front of the hive entrance. Hissing was frequently produced. The level of coordination among honeybees varied among colonies and apiaries. In colonies not exhibiting a coordinated behavior, the honeybees dispersed on the flight board and on the frontal wall of the hive. During observations in natural conditions, honeybees rarely abandoned the bee-carpet formation to attack the hornet. The construction of propolis wall was not observed except in one colony from the Saint-Sulpice-et-Cameyrac apiary.

In general, when the colony was defended with a coordinated behavior, hornets never attempted to land on the flight board, instead they hovered at about 15 cm from the entrance of the hive where they tried to catch foraging honeybees returning to and leaving the hive. Generally, hornets tended to attack returning foragers loaded with pollen, probably because they were heavier and flew more slowly and therefore they were easier to be caught. During our observations at the INRA apiary, the hornet was seen only six times coming accidentally in contact with the bee-carpet, and guard bees

engulfed and transported the hornet inside the hive on only one occasion. No dead hornet was observed in front of the hives. When the colony defense was not well organized, some bees were found to be isolated on the flight board and on the wall of the hive. In such situations, the hornet was particularly interested in these bees by controlling them closely (Fig. 22) and eventually by catching them with its legs. When the colony was weak and no bee-carpet was formed at the hive entrance, hornets entered in the hive to steal pollen and honey stores as well as larvae and pupae. The honey was consumed on site and exchanged with other hornets by trophallaxy. The latter is the only cooperative behavior that was observed among hornets in front of the hive. Generally, during the predatory activity, the hornet operated individually and various aggressive interactions were observed between attacking hornets.

Honeybees colony activity during simulated hornet attacks

In order to estimate the colony activity, the number of outgoing honeybees was counted. The tested colonies showed a common trend: when the hornet was brought at the hive entrance (T_1) the colony activity reduced in a significant way compared to when the hornet was not yet exposed to honeybees (T_0) (Fig. 24 and Table 12).

The generalized linear model showed differences among apiaries and between months regarding the colonies' activity. The colonies' activity was the highest at Saint-Sulpice-et-Cameyrac and then by decreasing order, at Nojals-et-Clotte, Artigues-près-Bordeaux, Bordeaux (INRA), Brive La Gaillarde, Limoges, Sarlat and finally it was the lowest at Domme. The colonies' activity was significantly higher in 2010 than in 2008. Activity was also significantly different among colonies and depending on testing order with colonies tested earlier showing reduced number of outgoing honeybees compared to colonies tested later. The predictor "month" was partially redundant with the predictor "apiary". Indeed, this predictor was based on only two apiaries in September, Domme and Sarlat. As both apiaries were only tested in September, the specific incidence of September and of these two specific apiaries cannot be dissociated. However, the predictor "month" was conserved because some apiaries were tested twice in August and in October (Table 9). For these two months, activity was significantly higher in August than in October. In the same way, the predictor "hornet exposure" was confounded with the predictor "apiary" because, whatever the year and month of the

experiment, an apiary was considered as either always exposed or never exposed to hornet predation since the beginning of the experiment, depending on the apiary. This predictor was therefore discarded from the analysis. Finally, the stepwise selection of predictors led to the rejection of the predictor “duration of exposure”. This indicates that this variable has no influence on the activity of the colony taking into account all other predictors. Taken alone, this predictor showed a significant effect on the activity of the colonies; when “duration of exposure” increased, the activity decreased. However, this effect can also be assessed through other predictors and better approached by them.

Bee-carpet behavior during simulated hornet attacks

Honeybee colonies were found to deploy a bee-carpet when the hornet was either brought close to or placed on the flight board. It was interesting to note that after 2 to 5 min of hornet attacks, the number of honeybees involved in the defense remained constant. The number of bees on the flight board and on the vertical walls near the entrance increased between T_0 and T_{20} by 30-60% in 14 colonies; by 60-80% in 17 colonies and by over 80% in 48 colonies. In the remaining 16 colonies, the number of bees did not increase, but 5 colonies exhibited the “bee-carpet” at the beginning of the experiment and the rest of the colonies appeared slightly active both in the defensive behavior and foraging activity.

For the analysis of the bee-carpet behaviour, the effect of all predictors was assessed (Table 12). Bee guards were in significantly higher numbers in August than in October and also more abundant in 2010 than in 2008, but they decreased when the “duration of exposure” increased. The opposite effect on bee-carpet behaviour between “year” and “duration of exposure” indicates that for colonies tested at a same period, the ones being exposed for a longer time to hornets present less guards on the flight board than the ones being exposed more recently. The number of bees on the flight board also differed among apiaries but the intensity of the guarding behavior did not follow the same sequence than activity. The Artigues apiary displayed the highest number of guards and then by decreasing order there were Bordeaux (INRA), Nojals-et-Clotte, Saint-Sulpice-et-Cameyrac, Sarlat, Limoges, Brive La Gaillarde and Domme apiaries. Within an apiary, the number of guards also varied significantly according to the “test order” predictor; the

size of the bee-carpet increased with the “test order”. Finally, the guarding behavior varied slightly among colonies.

Considerations about statistical analysis

Both generalized linear models were calculated using quasi-likelihood approach to take into account the over-dispersion of the variables. It indicated that our model failed to model all components of the variation of activity and bee-carpet behavior. The over-dispersion was far more pronounced for the bee-carpet behavior than for the activity: dispersions were estimated at 49.8 and 2.7, respectively.

Balling behavior

At T₁, the defensive behavior was never observed. However, when the hornet was placed on the flight board, honeybees engulfed it in a ball (68 colonies, i.e. 72%, exhibited this strategy) (Fig. 23). When the hornet was moved away from the hive entrance, only a small group of honeybees (up to 30 individuals) were still forming a ball around the predator. The ball size was variable: below 10 bees in 31 colonies (33%); between 10 and 20 bees in 20 colonies (21%); between 20 and 30 bees in 15 colonies (16%) and over 30 bees in only one colony.

The hornet survival status assessed after each simulated attack showed that only 9 hornets (9.5%) were killed by bees, but only two hornets were found with a stung.

Experiments conducted inside the hive

Results showed that honeybees were able to kill the hornets in 68% of the cases (i.e. 42 hornets were found dead and 13 alive). Among the dead hornets, only one got stung.

After 15 min, 20 min and 30 min, the death rates in hornets were 71% (i.e. 15 dead), 60% (i.e. 6 dead) and 40% (i.e. 2 dead), respectively. After one hour, all hornets were dead.

Some colonies appeared to be more effective than others in killing the hornets. For example, colony B7 killed the hornet in all seven experiments, whatever their duration. In contrast, colony B3 seemed inefficient, since it killed only three out of the 9 tested hornets and needed one hour for killing. Such variability did not seem to be related to the strength of colonies, because B3 and B7 colonies were of similar strength (Table 10).

Temperature inside the honeybee-ball

The temperature inside the ball that engulfed the hornet was found to increase rapidly. After 5-6 min, the temperature remained stable for about 15 min and then decreased slightly, but it never returned to its initial value. On average, the maximum internal ball temperature was $44.0 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ (Table 10). The classification of colonies from the highest to the lowest average maximum temperature was: B2, B5, B3, B1, B4 and B6, B7. The maximum internal ball temperature could not explain alone the hornet fate. In fact, the lowest maximum temperature (40.1°C) was recorded in colony B7, which killed the hornet in all experiments. In contrast, colony B3 described as poorly performing in hornet killing ranked third.

The mean temperature of the colony recorded by the second micro-probe was $23.8 \pm 2.7^{\circ}\text{C}$ while the mean environmental temperature during the experiment was $22.8 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$.

*Lethal thermal limit of *V. velutina**

When the hornets were placed inside an incubator, only five (18%) died when the temperature reached 45°C within the first 37 min. To test the other hornets, it was necessary to extend the experience up to one hour. In only one case, one hornet was still alive after one hour at 45°C (Table 11). It was concluded that the temperature produced by honeybees could be sufficient to kill the hornet *V. velutina*, but the influence of other factors cannot be excluded.

Discussion

In France, in late summer and early autumn when the population of *V. velutina* is at its maximum, honeybees may be severely impacted by the predation exerted by the hornet. *In situ* observations revealed that the predatory hornet visits beehives by adopting stationary flight around and near the entrance until it can intercept a forager returning or leaving the hive. This strategy called “bee-hawking” has already been described in *V. velutina* over its natural range of distribution (Ken *et al.* 2005; Tan *et al.* 2007).

In response to the presence of the new predator and in order to reduce its deleterious impact on colonies, the European honeybees in France seem to have adopted a short-term response which appears however inefficient. This strategy consists in a reduction of the colony activity followed by the development of a tight group of workers on the flight board or on the vertical walls near the entrance forming a “bee-carpet”. The same strategy has been observed on natural predators such as *V. crabro* and *V. orientalis*, associated with an efficient defense of the nest (Baracchi *et al.* 2010; Papachristoforou *et al.* 2011).

Reduction in foraging activity and formation of the bee-carpet are a general trend that could be explained by the recruitment of foraging honeybees for defense as proposed in a comparative study of the defensiveness between “docile” and “super-aggressive” *A. mellifera* colonies (Kastberger *et al.* 2009).

On the other hand, in the long-term, the effect of the predation pressure on foraging activity and bee-carpet behavior appears to be different: both decrease when predation pressure increases. Especially, for the colonies tested in September and October, when predation pressure was higher, a lower number of bees involved in the bee-carpet was recorded, compared to the observations conducted in August, when predation pressure was lower. Similarly for the colonies tested at the same period, the ones being exposed to hornets for a long time were less numerous on the flight board than the ones being exposed more recently. These opposed trends between long-term and short-term effects may be due to different factors. The defensive responses in *A. mellifera* may be affected by meteorological conditions (Southwick and Moritz 1987). The decrease in flight activity and in the number of honeybees involved in the bee-carpet in response to an

increase in predation pressure could also be related to a specific strategy where colonies retreat in the hive to defend their nest (Kastberger *et al.* 2009; Papachrisoforou *et al.* 2011). The low colonies' activity recorded in September and October could also be linked to a lower food availability as pollen foraging activity may be lower at this period of the year, depending on flowering phenology. Alternatively, it could also correspond to the weakening of the colony after a continuous predation by hornets in the preceding months. However, in order to confirm these statements, it would be interesting to know the strength and the survival status of the colonies after several months of hornets' predation. Unfortunately, this information is difficult to find because beekeepers often replace lost colonies by new swarms, but this common practice is poorly documented.

However, the *A. mellifera* defensive behavior against the invasive predatory hornet *V. velutina* appeared inefficient compared to the behavior described in previous studies where preys and predators are sympatric (Abrol *et al.* 1994; Kastberger and Sharma 2000; Ken *et al.* 2005; Abrol *et al.* 2006). When hornets approach clusters of guard bees, the latter seemed unable to seize and hold the engulfed hornet. On three occasions only, honeybees were observed leaving the cluster in an attempt to capture the attacking hornet. During many days of observations in several apiaries and under variable environmental conditions, balls of honeybees naturally formed were never observed, although this defensive strategy was previously described in the literature (Ono *et al.* 1987, 1995; Ken *et al.*, 2005; Papachristoforou *et al.* 2007; Baracchi *et al.* 2010). In France, this behavior only occurred when experimentally triggered. However, the number of bees engulfing predatory hornets was much lower than in *Apis cerana* (Ono *et al.* 1987; Ono *et al.* 1995; Ken *et al.* 2005; Abrol 2006) and *A. m. ligustica* (Baracchi *et al.* 2010). However, it was similar to that observed in China by Ken *et al.* (2005) for *A. mellifera* against *V. velutina*. Only 9.5% of the tested hornets were killed by balling within the 5 min of simulated attacks whereas about 22.2% died of a sting, a defensive strategy that is absent among sympatric honeybees and hornets. Nevertheless, the honeybees were able to kill the hornet only when artificially introduced inside the hive for long time. We demonstrated that *A. mellifera* in France produced a temperature high enough to kill the hornet. The time required to kill the new predator is more than 30 min, both in the incubator and inside the hive. However, while the temperature may be

lethal, other factors like the production of CO₂ (Sugahara and Sakamoto 2009) and the limitation in the functioning of the respiratory system (Papachristoforou *et al.* 2007) cannot be excluded. These factors should be further investigated. Indeed, colonies of the same strength and exhibiting slightly different temperatures inside the ball displayed also different levels of efficiency in killing the hornet.

When foraging activity and number of honeybees involved in the bee-carpet were considered, the honeybees' defensive behavior varied among apiaries and colonies. Some colonies invested more in foraging activity and less in defense, while other colonies showed an opposite trend. Such variations may be explained by different colonies' strength and stores or different climatic conditions among apiaries location. It could also be related to the genetic composition of the different colonies (e.g. at the subspecies level). Indeed, in France, *A. m. mellifera* (lineage M) is the native subspecies, but *A. m. ligustica* and *A. m. carnica* (lineage C) can also be widely used (Rortais *et al.* 2007).

Many authors (Rothenbuhler 1960; Stort 1974; Collins *et al.* 1980, 1988; Moritz *et al.* 1985; Guzmán-Novoa and Page 1993, 1994) have demonstrated the importance of the genetic pool in honeybee aggressiveness and defensiveness, with some strains being more aggressive than others (Ruttner 1988; Breed *et al.* 2004). Beekeeping management-wise, European races of *Apis mellifera* are the most widely used honeybees and genetic selection programs usually favor calmness over irritability traits. The lack of aggressiveness, the inability to attack the bee-hawking hornets in front of the hive entrance and to rapidly recruit a sufficiently large number of honeybees in balling behavior, seems to be the causes of an ineffective defense.

The direct attacks of the hornet by honeybees are also made difficult by the highly effective predatory behaviors of *V. velutina*. In contrast to other well-described predatory habits observed in other *Vespa* species (Ono *et al.* 1995; Papachristoforou *et al.* 2007; Tan *et al.* 2007; Baracchi *et al.* 2010) *V. velutina* attempt to land the honeybee hive flight board and to enter in the hive only when the colony is too weak to react, but have a stationary flight and catch the honeybees at safety distance if the colony is healthy.

Clearly *V. velutina* in France has proven its highly predatory potential. Its predation strategy appears very costly for the survival of the colony. Contrarily to honeybee species sympatric with predatory hornet, *A. mellifera* against *V. velutina* in France did not develop an efficient defensive strategy at the colony level. The constant presence of the hornet in stationary fly in front of the bee-hive entrance reduces the foraging activity and a large number of honeybees is involved in the bee-carpet defensive behavior. Future studies will focus on the progressive weakening of colony in order to better understand if it resulted from the reduced flow of food form the environment or by the number of foragers effectively caught by the hornet.

The Yellow-legged hornet therefore appears as an additional factor causing a progressive decline in *A. mellifera* colonies and its expansion across Europe represents a potential future threat to European honeybees.

Acknowledgments

We would like to thank all French beekeepers for permission and their kindness to do research at their apiaries. We also thank Quentin Rome (MNHN, Paris) for information on the current range of *V. velutina* in Europe and for the distribution map. This study was financially supported by France AgriMer (Programme communautaire pour l'Apiculture, 2008-2011) and CNRS core budgets.

References

- Abrol DP (1994). Ecology, behaviour and management of social wasp, *Vespa velutina* smith (Hymenoptera: Vespidae), attacking honeybee colonies. Korean Journal of Apiculture 9(1): 5
- Abrol DP (2006). Defensive behaviour of *Apis cerana* F. against predatory wasps. Journal of Apicultural science 50(2): 39
- Archer ME (1998) Taxonomy, Distribution and nesting biology of *Vespa orientalis* L. (Hym., Vespidae). Entomol Mon Mag 134: 45–51
- Baracchi D, Cusseau G, *et al.* (2010). Defence reactions of *Apis mellifera* ligustica against attacks from the European hornet *Vespa crabro*. Ethology Ecology & Evolution 22(3): 281-294.
- Breed MD, Guzmán-Novoa E and Hunt GJ (2004) Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees. Annual Review of Entomology 49: 271-298.
- Butler CG (1954). The world of the honeybee. 226 p. Collins, London.
- Castro L and Pagola-Carte S (2010). *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae), recolectada en la Península Ibérica. Heteropterus Revista de Entomología (10): 193–196
- Collins AM (1980) Effect of age on the response to alarm pheromones by caged honey bees. Annals of the Entomological Society of America 73(3): 307-309
- Collins AM, Rinderer T and Tucker K (1988) Colony defense of two honeybee types and their hybrid. 1 Naturally mated queens. J. Apic. Res. 27: 137-140.
- Gallai N, Salles J, Settele J and Vaissiere B (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecological Economics 68: 810-821.
- Grosso-Silva JM and Maia M (2012). *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Vespidae), new species for Portugal. Arquivos Entomológicos. 6: 53-54.

- Guzmán-Novoa E and Page RE (1993) Backcrossing Africanized honey bee queens to European drones reduces colony defensive behavior. *Annals of the Entomological Society of America* 86(3): 352-355
- Guzmán-Novoa E and Page RE (1994) Genetic dominance and worker interactions affect honeybee colony defense. *Behavioral Ecology* 5(1): 91-97.
- Kastberger G and Sharma DK (2000). The predator-prey interaction between blue-bearded bee eaters (*Nyctyornis athertoni* Jardine and Selby 1830) and giant honeybees (*Apis dorsata* Fabricius 1798). *Apidologie* 31(6): 727-736
- Kastberger G, Schmelzer E, *et al.* (2008). Social Waves in Giant Honeybees Repel Hornets. *Plos One* 3(9). doi e3141
- Kastberger G, Thenius R, Stabentheiner A, Hepburn R (2009). Aggressive and docile colony defence patterns in *Apis mellifera*. A retreat-releaser concept. *J. Insect Behav.* 22: 65-85.
- Ken T, Hepburn HR, *et al.* (2005). Heat-balling wasps by honeybees. *Naturwissenschaften* 92(10): 492-495
- López S, González M, Goldarazena A (2011), *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae): first records in Iberian Peninsula. *EPPO Bulletin*, 41: 439-441.
- Matsuura M and Yamane S (1990) *Biology of the vespine wasps*. Springer-Verlag, Berlin; New York.
- Mishra, R.C, Kumar,J and Gupta,J.K (1989). A new approach to the control of predatory wasps (*Vespa* sp) of the honey bee, *Apis mellifera*. *Indian J. apic. Res.*, 28:126-131
- Moritz RF, Southwick EE and BrehM(1985)A metabolic test for the quantitative analysis of alarm behavior of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Experimental Zoology* 235(1): 1-5.
- Morse, R.A. (1978). *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. CornellUniversity Press, Ithaca, NY, USA, 430 pp.

- Ono M, Okada I, *et al.* (1987). Heat production by balling in the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* as a defensive behavior against the hornet, *Vespa simillima xanthoptera* (Hymenoptera: Vespidae). *Experientia* 43: 1031
- Ono M, Igarashi T, Ohno E, Sasaki M (1995) Unusual thermal defence by a honeybee against mass attack by hornets. *Nature* 377:334–336
- Paar J, Oldroyd BP, *et al.* (2004). Genetic structure of an *Apis dorsata* population: The significance of migration and colony aggregation. *Journal of Heredity* 95(2): 119-126.
- Papachristoforou A, Rortais A, *et al.* (2007). Smothered to death: Hornets asphyxiated by honeybees. *Current Biology* 17(18): R795-R796.
- Papachristoforou A, Sueur J, *et al.* (2008). High frequency sounds produced by Cyprian honeybees *Apis mellifera cypria* when confronting their predator, the Oriental hornet *Vespa orientalis*. *Apidologie* 39(4): 468-474
- Papachristoforou A, Rortais A, *et al.* (2011). Attack or retreat: Contrasted defensive tactics used by Cyprian honeybee colonies under attack from hornets. *Behavioural Processes* 86(2): 236-241.
- Rome Q, Muller F and Villemant C (2012). Expansion 2011 de *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae) en Europe. *Bulletin de la Société Entomologique de France*. Under press.
- Rortais A, Arnold G, Garnery L (2007) Introgressions and structure of the genetic diversity of the black honeybee in France. *Proceedings of the second European conference of Apidology Eurbee*. V. Vesely, M. Vořechovská and D. Titěra Ed. Prague, Czech Republic, 10-16 September 2006. p59.
- R Development Core Team. (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. , <http://www.R-project.org>.
- Rothenbuhler WC (1960) A technique for studying genetics of colony behavior in honey bees. *Am. Bee J.* 100:176-198.

- Ruttner F (1988) Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer, Berlin
- Sakagami SF and Akahira Y (1960) Studies on the Japanese honey- bee, *Apis cerana cerana* Fabricius. VIII. Two opposing adaptations in the poststinging behavior of honeybees. *Evolution* 14:29–40
- Shah F and Shah T (1991). *Vespa velutina*, a serious pest of honey bees in Kashmir. *Bee World* 72: 161-164
- Southwick EE and Moritz RFA (1987). Effects of meteorological factors on defensive behavior of honey bees. *International Journal of Biometeorology* 31: 259-265.
- Stort AC (1974) Genetic study of aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. I Some tests to measure aggressiveness. *J. Apic. Res.* 13:33-38.
- Sugahara, M. & Sakamoto, F. (2009) Heat and carbon dioxide generated by honeybees jointly act to kill hornets. *Die Naturwissenschaften*, 96, 1133-6.
- Tan K, Radloff SE, *et al.* (2007). Bee hawking by the wasp, *Vespa velutina*, on the honeybees *Apis cerana* and *A. mellifera*. *Naturwissenschaften* 94(6): 469-472.
- Tan K, Li H, *et al.* (2010). Wasp hawking induces endothermic heat production in guard bees. *Journal of Insect Science* 10. doi 142
- Villemant C, Haxaire J, Streito JC (2006) Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, 111, 535.
- VILLEMANT C (2008) *Apis cerana* se défend contre *Vespa velutina* : observations dans le massif forestier du Bi Doup, Vietnam (Hym.). *Bulletin de la Société entomologique de France* 113 : 312-312.
- Villemant C, Barbet-Massin M, *et al.* (2011). Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. *Biological Conservation* 144(9): 2142-2150.

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

Table 9. Information on the eight experimental apiaries selected for the hornet simulated attacks experiments.

Apiary location	Experimental dates	Exposure levels	Exposure duration in number of years	No Colony/ID
<i>Artigues-près-Bordeaux</i>	October 2008	High	1	10/A1-A10
<i>Bordeaux (INRA)</i>	August 2008	High	1	5/I1-I5
	October 2008	High	1	6/B1-B4; B6-B7
	August 2010	High	3	7/2.1-2.3; B4-B6; C
<i>Nojals-et-Clotte</i>	August 2008	Low	1	6/ N1-N6
	October 2008	Low	1	5/ N2-N6
<i>Saint-Sulpice-et-Cameyrac</i>	August 2008	Low	0	10/ SS1-SS10
	October 2008	Low	0	9/ SS1-SS8; SS10
	August 2010	Low	2	2/1SS-2SS
<i>Limoges</i>	August 2010	High	1	8/1L-8L
<i>Brive La Gaillarde</i>	August 2010	High	1	9/1B-9B
<i>Domme</i>	September 2010	Low	0	9/ D1-D9
<i>Sarlat</i>	September 2010	Low	2	9/ S1-S9

Table 10. *Vespa velutina* survival status after experiments inside the hive.

Colony ID	Experiment duration									Max. temperature in the ball		Colony strength
	15 min	15 min	15 min	20 min	20 min	30 min	1h	1h	1h	mean	s.d.	
B1	dead	alive	dead	NA	NA	NA	NA	dead	dead	43.8	1.0	11
B2	dead	dead	dead	alive	dead	dead	dead	dead	dead	44.4	0.6	10
B3	alive	alive	alive	alive	alive	alive	dead	dead	dead	43.9	1.4	11
B4	dead	dead	dead	dead	dead	alive	dead	dead	dead	43.6	1.2	10
B5	dead	dead	dead	alive	dead	alive	dead	dead	dead	44.3	0.6	10
B6	dead	alive	alive	NA	NA	NA	NA	dead	dead	43.6	1.2	5
B7	dead	dead	dead*	dead	dead	dead	dead	dead	dead	42.8	2.4	11

NA: data not available. *indicates that the hornet showed a sign of sting.

Table 11. Determination of *V. velutina* lethal thermal limit.

Test	No hornets	Dead at 45°C	Dead at the end	Alive at the end	Test duration
1	6	2	6	0	37 min
2	9	1	9	0	48 min
3	5	1	4	1	1 hour
4	7	1	7	0	54 min

The table gives the number of hornets tested at each experimentation in incubator, the number of hornets dead at 45°C, the number the hornet dead at the end of the test, the number of hornets alive at the end of the test and the test duration.

Table 12. Contribution of the predictors to explain the variation in activity and bee-carpet behavior.

		Activity		Bee carpet behavior	
		P-value		P-value	
predictors	Time	7.10E-09	***	< 2.2e-16	***
	Apiary	< 2.2E-16	***	2.45E-07	***
	Year	4.82E-07	***	1.06E-03	***
	Month	5.10E-15	***	8.47E-08	***
	Duration of exposure	-		1.91E-04	***
	Colony	< 2.2E-16	***	0.01596	*
	Test order	0.0004104	***	0.006529	**

The table gives the P-values of the chi-square test comparing the global model with all predictors and model with all predictors except the one tested.* indicates statistical significance.

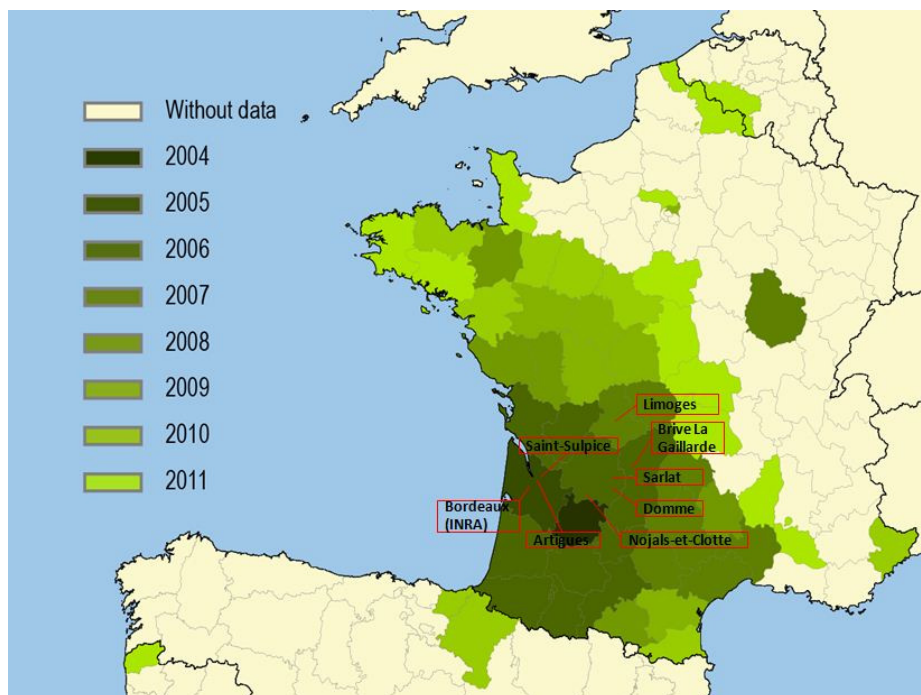


Figure 20. Map of apiaries location. In green known range of *V. velutina* in Europe. (Rome et al. 2012)



Figure 21. A honeybee colony under hornet predation pressure. The foraging activity is totally stopped and a large number of honeybees covered the bee-hive flight board to form a "bee-carpet".



Figure 22. *Vespa velutina* attacking isolated honeybees.

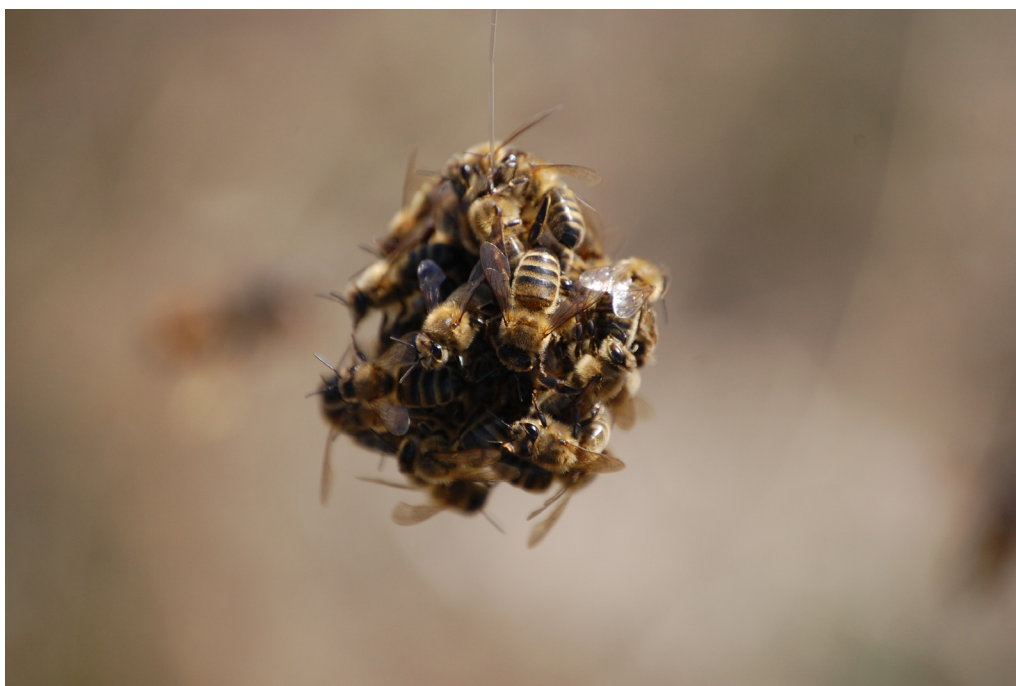


Figure 23. Balling behavior of *Apis mellifera* in simulated *Vespa velutina* attacks.

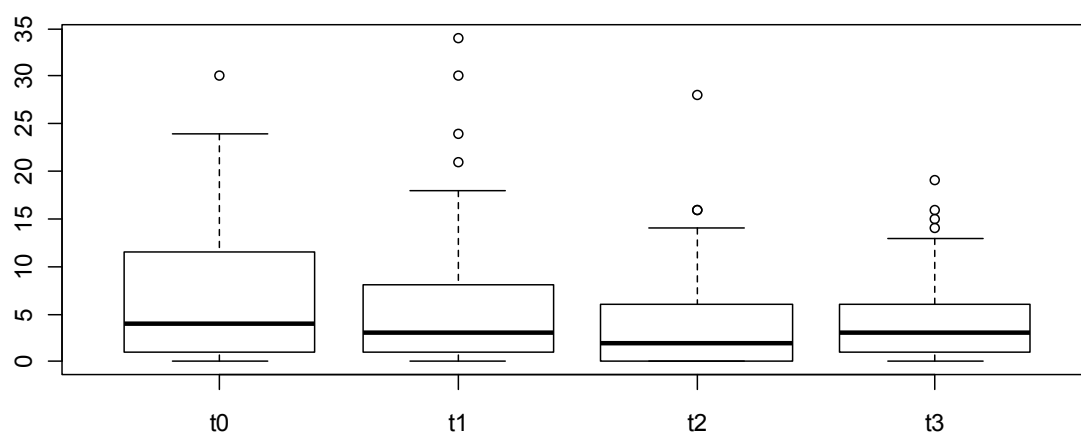


Figure 24. Activity of the colonies in response to hornet simulated attacks.

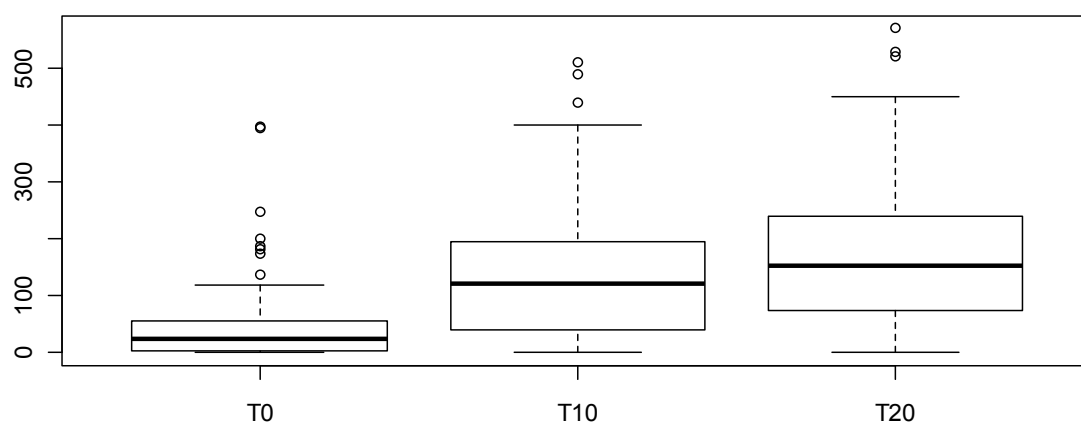


Figure 25. Number of guards on the bee-hive flight board in response to hornet simulated attacks.

VII.2. IMPACT DE LA PREDATION DE *V. VELUTINA* SUR L'ACTIVITE DES ABEILLES.

Afin de mieux décrire l'impact du frelon *V. velutina* sur les colonies d'*A. mellifera* j'ai analysé en continu l'activité des abeilles face à la prédation du frelon en conditions naturelles.

VII.2.1. MATERIELS ET METHODES

Description du système d'enregistrement vidéo

Pour réaliser cette étude il a été nécessaire d'utiliser un système d'enregistrement vidéo qui n'altère pas l'activité des frelons et des abeilles. Ce système, mis à point en collaboration avec la société lyonnaise, ViewPoint, spécialisée dans la réalisation de systèmes d'analyse du comportement animal, est composé d'une caméra numérique noir et blanc protégée par un étui imperméable à l'eau. Elle est placée à environ 1,5m du sol de manière à observer directement l'entrée de la ruche ainsi que l'environnement immédiat de la planche d'envol. La camera est reliée à un ordinateur qui est placé à proximité, dans un caisson de protection également imperméable à l'eau. L'ordinateur, grâce au logiciel « Numeriscope » (ViewPoint), permet de démarrer et d'arrêter l'enregistrement automatiquement selon les horaires de lever et de coucher du soleil et de filmer en continu l'entrée de la ruche. Les enregistrements vidéo sont stockés sur un disque externe branché à l'ordinateur (**Figure 26 A**).

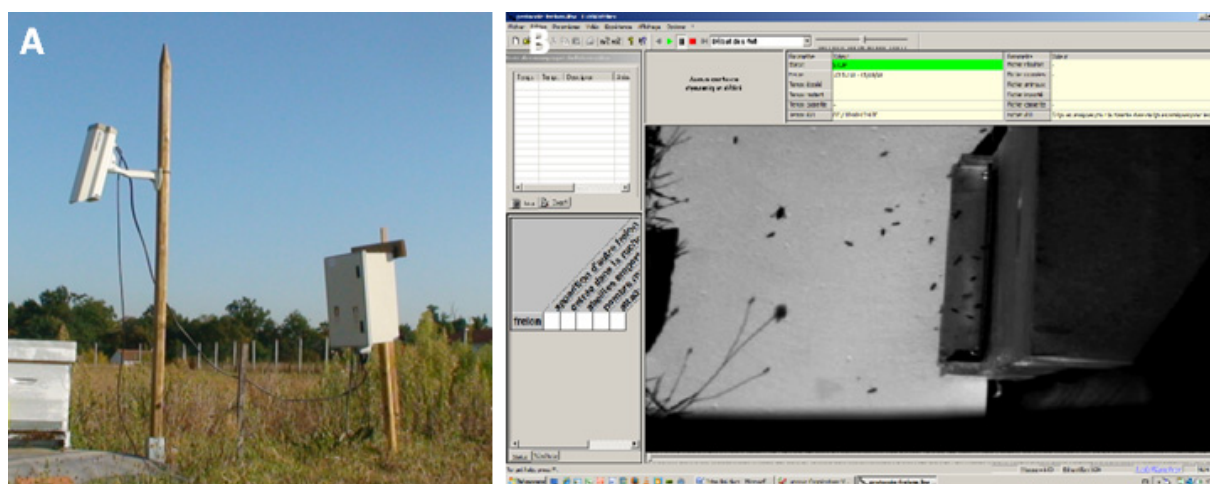


Figure 26. Système d'enregistrement vidéo de l'activité des abeilles et des frelons en conditions naturelles. A : Equipement vidéo non intrusif: caméra et ordinateur positionnés devant une ruche, site INRA Bordeaux. B : Logiciel Labwatcher (ViewPoint) et image de la planche d'envol et de son environnement immédiat.

Ce système présente l'avantage d'être non intrusif et de permettre l'observation de l'activité des abeilles et des frelons en conditions naturelles. Il permet d'effectuer les analyses à distance et tout au long de l'année indépendamment du cycle biologique des deux insectes.

Caractérisation des colonies étudiées

Les deux colonies (D2 et D3) observées au cours de cette étude sont situées sur le site de l'INRA de Bordeaux. Afin de distinguer la sous-espèce d'abeille présente dans les deux colonies étudiées, une méthode de morphométrie géométrique a été employée. Les coordonnées de 19 points-repères des ailes gauches ont été mesurées sur un groupe de 10 ouvrières de chaque colonie. Les coordonnées des points-repères ont été comparées à la base de données Apiclass, qui a été réalisé grâce à l'identification morphométrique et moléculaire de plus de 5000 ouvrières. Le résultat de la comparaison avec la base de données a montré que les deux colonies étudiées appartenaient à la sous-espèce *A. m. mellifera* (abeille noire locale).



Figure 27. Système expert en ligne ApiClass qui utilise la structure des ailes des ouvrières pour discriminer et identifier les différentes races et lignées de l'abeille domestique. Il fait appel pour cela aux approches récentes de la morphométrie géométrique. Les chiffres en rouges indiquent les 19 points-repères correspondant aux intersections des principales nervures des ailes antérieures (<http://apiclass.mnhn.fr/>).

Analyses des séquences vidéo

L'acquisition des images a été réalisée du 20 juin au 30 novembre 2009. En raison des quantités considérables d'images à analyser (plusieurs mois en continu x toute la journée x 2 colonies), l'analyse a été réalisée sur un échantillon d'images prises à intervalles réguliers. Pour cet échantillonnage, j'ai retenu un jour sur cinq (sauf situation météorologique défavorable à l'activité des insectes ou problème technique). Les séquences vidéo ont ensuite été analysées au ralenti (vitesse = 1/5) au moyen d'un logiciel interactif d'enregistrement d'évènement (LabWatcher, ViewPoint, France) (**Figure 26 B**).

Au cours d'une journée, des séquences de durée variable ont été analysées : un temps d'étude de 2 minutes a été utilisé pour les abeilles tandis qu'un temps plus long a été nécessaire pour les frelons (5 minutes). En effet, la présence du frelon est assez aléatoire surtout au début de la saison et deux minutes est un temps trop court pour être représentatif. En ce qui concerne les abeilles, leur activité augmente de manière linéaire avec le temps d'étude. Dans ce cas, deux minutes suffisent pour évaluer l'activité des abeilles. Des séquences ont été analysées toutes les deux heures, à partir de 8h. Selon la durée du jour (liée à la saison), le nombre de séquences quotidiennes analysées a donc varié entre huit en été et quatre en novembre.

Afin d'évaluer l'activité des colonies le nombre d'entrées d'abeilles dans la ruche et le nombre de sorties d'abeilles de la ruche ont été comptabilisés. Le comportement de défense éventuel des abeilles a été évalué par le *nombre d'abeilles présentes sur la planche d'envol* au début de chaque séquence analysée.

Parallèlement, la pression de prédation exercée par les frelons a été quantifiée par le *nombre de frelons présents devant la ruche* et par le *nombre d'abeilles capturées*.

Les conditions météorologiques qui pourraient également influencer fortement l'activité des colonies d'abeilles ont été prises en compte au cours de l'étude. Plusieurs paramètres journaliers sont enregistrés par la station météo du site de l'INRA: hauteur des précipitations mesurée en mm, vitesse moyenne du vent mesurée en mètres par seconde, température moyenne, température minimale et température maximale mesurées toutes 3 sous abri et relevées en degrés Celsius.

VII.2.2. RESULTATS

Les données analysées ont permis de mettre en évidence une évolution de l'activité des abeilles (entrées et sorties de la ruche) en fonction du temps. Comme les courbes des entrées et des sorties présentent le même patron temporel, seules les courbes des entrées (pour les deux ruches D2 et D3) sont présentées.

Les **figures 28 A** et **29 A** montrent le nombre d'abeilles entrant dans les ruches D2 et D3 en fonction du temps, entre juin et novembre 2009. L'activité des colonies D2 et D3 présente, globalement, le même patron temporel, avec en particulier une forte diminution de l'activité à partir de mi-août. Ensuite l'activité reste relativement faible jusqu'à la fin de la période d'analyse, exception faite d'un deuxième pic d'activité observé fin août pour D2 et de la mi-août au début septembre pour D3). La colonie D2 présente une activité plus faible que la colonie D3 (au maximum 1100 entrées comptées par jour pour D2 contre 1800 pour D3). Si on considère l'activité journalière des deux colonies, de fin juin à mi-juillet, l'activité est la plus forte de 12h à 16h. De mi-juillet à mi-août l'activité est plus forte en début de journée. Par la suite, l'activité est très faible voir nulle (les données n'apparaissent pas sur le graphique). Le comportement de défense des abeilles a été évalué par le nombre d'abeilles présentes sur la planche d'envol au début de chaque séquence analysée. Les **figures 28 B** et **29B** représente les variations de ce paramètre cumulé sur une journée de juin à novembre 2009. Entre le 20 juin et le 30 juillet, presque aucune abeille n'est présente sur la planche d'envol. A partir de cette date, le nombre d'abeilles sur la planche d'envol augmente fortement pour atteindre un maximum le 16 août pour la colonie D2 et le 24 août pour la colonie D3. Il diminue ensuite pour revenir à une valeur nulle vers la mi-octobre. Ce phénomène se manifeste à partir de 10h et la grappe d'abeilles sur la planche se maintient tout au long de la journée avec de petites fluctuations du nombre d'abeilles impliquées (les données ne paraissent pas sur les graphiques).

La pression de prédation a été quantifiée par le nombre de frelons présents devant la ruche et par le nombre d'abeilles capturées. Les **figures 28 A** et **29A** représente le **nombre de frelons** (comptés sur une journée) présents devant les ruches D2 et D3 en fonction du temps. Pour les deux ruches, la première apparition d'un frelon a été observée le 10 juillet à 21h00. A partir de cette date, le nombre de frelons n'a pas cessé

d'augmenter. Il a atteint un maximum le 28 octobre pour la ruche D2, avec 114 frelons comptés, et le 28 septembre pour la ruche D3, avec 65 frelons comptés. Pour la ruche D2, le nombre de frelons a chuté rapidement après le 25 octobre. Ainsi, le 29 novembre, dernier jour d'analyse, un seul frelon a été observé sur toute la durée de la journée. Pour la ruche D3, mis à part quelques variations, le nombre de frelons observés est resté globalement constant du 8 septembre au 26 octobre (une cinquantaine de frelons comptés sur la journée). Ensuite la pression de frelon devant la ruche a diminué suivi d'une nouvelle augmentation entre le 12 et le 17 novembre. L'activité journalière des frelons se concentre majoritairement de 10h à 18h, ce qui englobe une grande partie de la période d'observation (ces données ne sont pas illustrées).

Le nombre d'abeilles capturées augmente en fonction de l'accroissement du nombre de frelons présents devant la ruche puis diminue vraisemblablement en lien avec la baisse d'activité des abeilles. Le plus grand nombre de captures se situe entre le 4 août et le 8 septembre, ce qui correspond à la reprise de l'activité des abeilles (deuxième pic d'activité). J'ai compté jusqu'à 14 abeilles capturées sur 40 minutes de séquences vidéo analysées en août (huit séquences quotidiennes d'une durée de 5 minutes) (**Figure 28 C et 29C**). Les captures ont été enregistrées tout au long de la journée sans révéler des différences apparentes en termes de fréquence horaire (ces données ne sont pas illustrées).

Les courbes des températures (maximales, minimales et moyennes) des figures 28 D et 29 D montrent que la température fluctue légèrement tout au long de la période étudiée et subit une diminution progressive à partir du 11 novembre. Des hauteurs de précipitations supérieures à 4 mm ont été enregistrées le 30 juin, le 10 et 15 juillet et le 9 août des vitesses du vent modérées (4-6 mm/sec) ont été enregistrées le 12 et 20 septembre, le 15 octobre et les 4 et 5 novembre. Elle était supérieure à 8 mm/sec (vitesse à laquelle les abeilles arrêtent presque complètement leur activité (Clément et al. 2006)) seulement le 29 novembre.

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

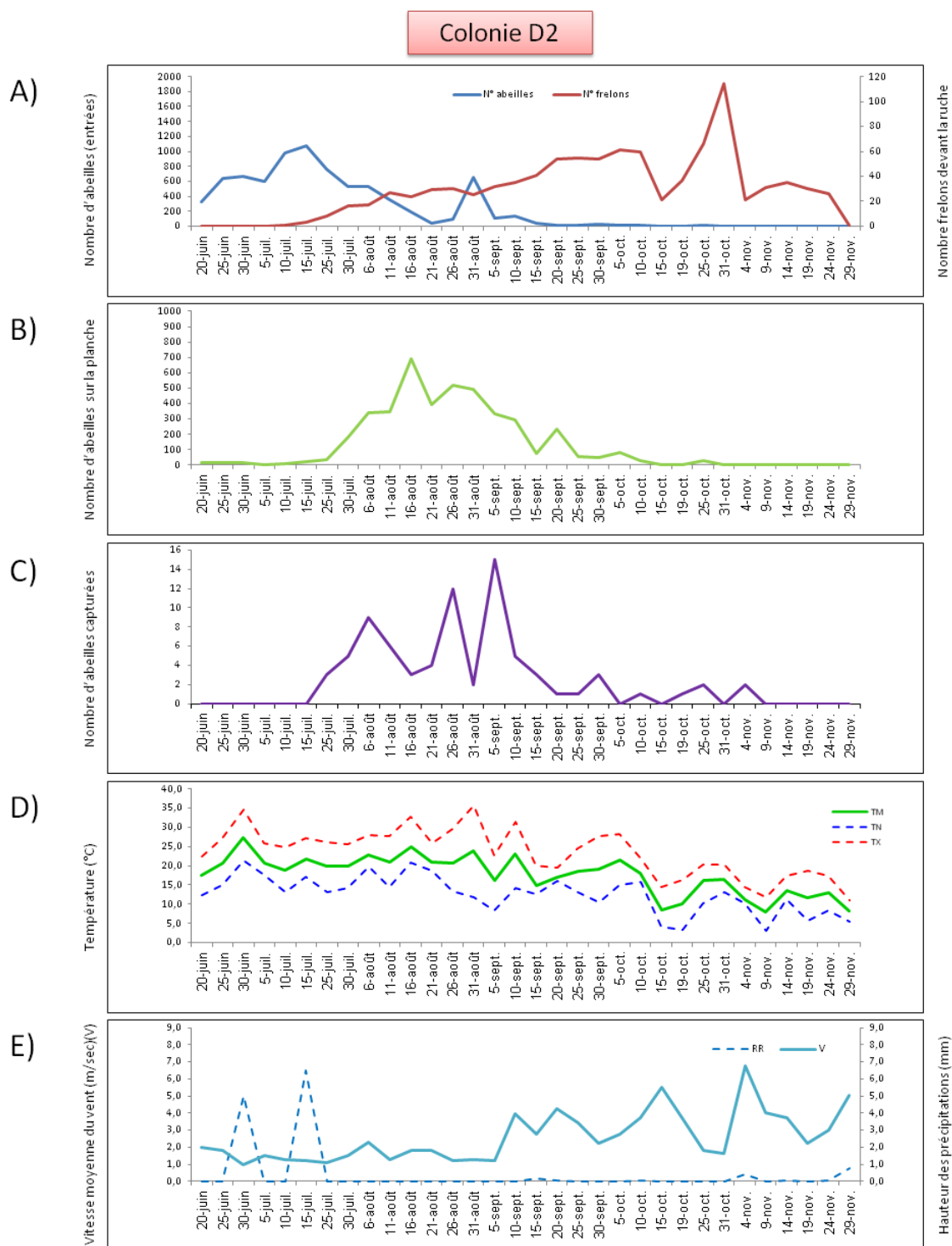


Figure 28. Activité saisonnière des deux colonies d'abeilles D2 mise en relation avec la pression de prédation exercée par le frelon et les conditions météorologiques. A : nombre d'abeilles entrant dans la ruche (courbe bleue) et nombre de frelons devant la ruche (courbe rouge). B : Nombre d'abeilles observées sur la planche d'envol. C : Nombre d'abeilles capturées par jour par le frelon. D : température moyenne (TM), température minimale (TN) et température maximale (TX) journalières. E. vitesse du vent et hauteur des précipitations journalières

Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae)

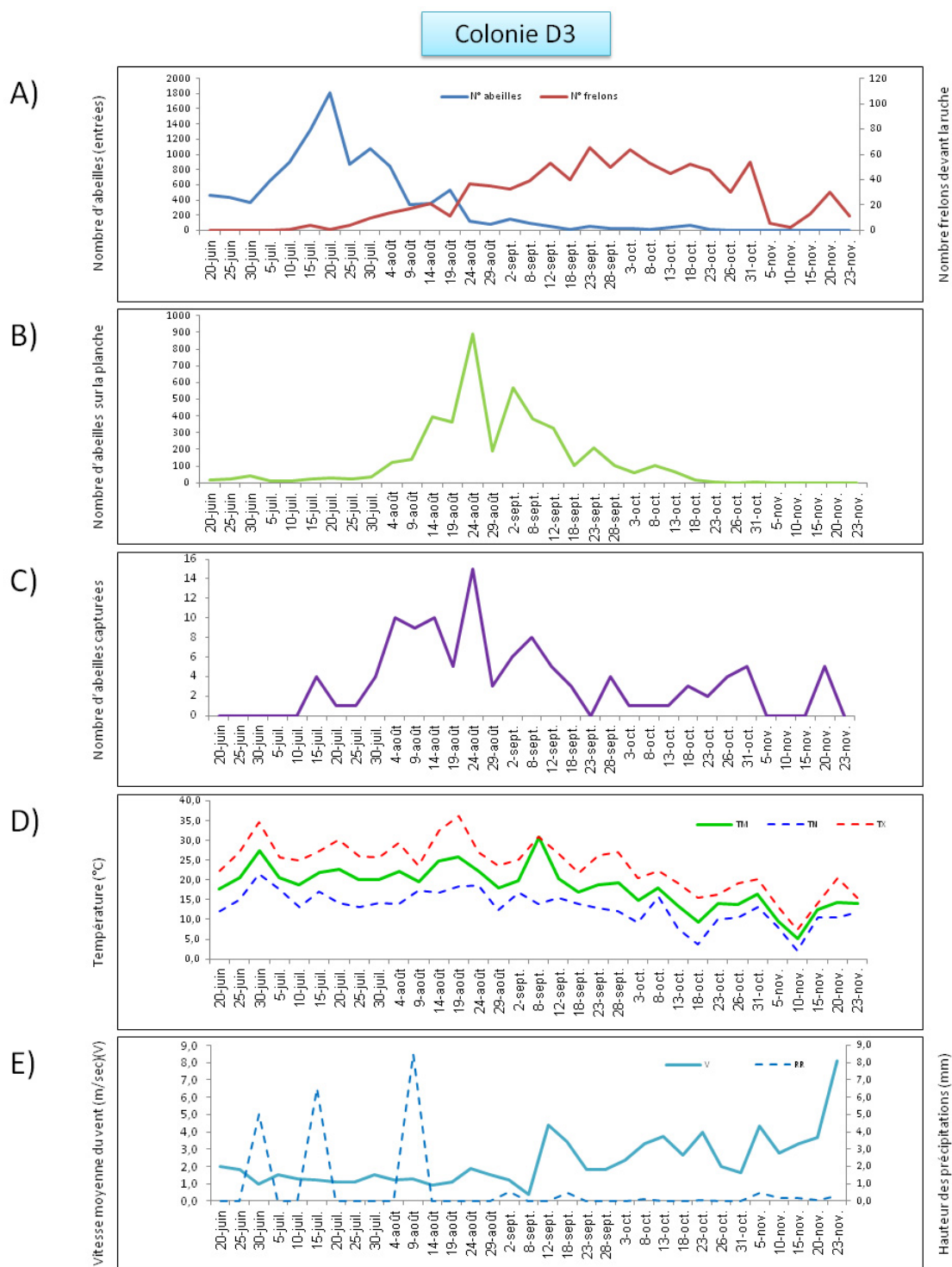


Figure 29. Activité saisonnière des deux colonies d'abeilles D3 mise en relation avec la pression de prédation exercée par le frelon et les conditions météorologiques. A : nombre d'abeilles entrant dans la ruche (courbe bleu) et nombre de frelons devant la ruche (courbe rouge). B : Nombre d'abeilles observé sur la planche d'envol. C : Nombre d'abeilles capturées par jour par le frelon. D : température : moyenne (TM), température minimale (TN) et température maximale (TX) journalières. E. vitesse du vent et hauteur des précipitations journalières.

VII.2.3. DISCUSSION

Les observations conduites en conditions naturelles ont permis de décrire l'évolution de l'activité de deux colonies d'abeilles soumises à la prédation du frelon asiatique. L'activité des colonies a été évaluée par deux paramètres différents. D'une part, l'activité de butinage, c'est-à-dire le nombre d'abeilles qui quittent la colonie pour récolter de la nourriture (nectar et pollen) et qui y retournent. Pour des raisons de commodité de présentation, seules les abeilles qui reviennent à la colonie ont été dénombrées. D'autre part, l'activité de gardiennage de la colonie, évaluée par le nombre d'abeilles présentes sur la planche d'envol. Ces données ont été mises en relation avec les données météorologiques et la pression de prédation exercée par le frelon (nombre de frelon présents devant l'entrée de la ruche et nombre d'abeilles capturées).

La superposition, pour les deux colonies, du comptage des entrées d'abeilles et du nombre de frelons (**Figure 28 A et 29A**), a permis de mettre en évidence la concordance entre les variations d'activité de ces espèces antagonistes. En effet, il ya concomitance entre l'arrivée des frelons et la brusque diminution d'activité de la colonie. Par ailleurs, le pic de présence quotidienne maximum du frelon correspond à la période de plus faible activité des abeilles. Cette constatation conduit donc à proposer que la diminution d'activité des colonies d'abeilles pourrait être liée à l'apparition des frelons, puis à l'augmentation de leur nombre. Un effet de la température est exclu parce que l'activité des abeilles devient très faible pour les deux colonies bien avant la chute des températures. Pareillement, vitesse du vent et pluviométrie ne semblent pas être limitant pour l'activité des abeilles.

L'augmentation du nombre d'abeilles sur la planche d'envol semble elle aussi reliée à la présence des frelons, puisque, quelques jours après l'apparition des premiers frelons, le nombre d'abeilles sur la planche d'envol augmente considérablement. Il est probable qu'elles sortent pour bloquer l'entrée de la ruche et empêcher le frelon d'y entrer. Cette mobilisation des abeilles dans cet effort de défense constitue un facteur supplémentaire pour expliquer la forte réduction de l'activité de butinage.

Ce comportement, semble également permettre, dans un nombre très limité de cas l'élimination du frelon (6 cas observés au cours des analyses des séquences vidéos). Il a ainsi été constaté que les abeilles peuvent s'agglutiner autour d'un frelon qui passe à

leur portée, et former une petite boule d'une dizaine d'individus au maximum. Les attaques observées se sont terminées soit dans la ruche, soit sur le sol, soit sur la planche d'envol et ont duré environ 5 minutes. Toutefois, compte tenu de la très forte pression de prédation exercée par les frelons, les rares frelons tués par les abeilles représentent une quantité négligeable par rapport au nombre total de frelons.

Malgré la mise en place de ce comportement de défense, le nombre d'abeilles capturées est important. En effet la quinzaine d'abeilles capturées par jour évaluée dans cette étude ne reflète que les pertes réalisées au cours d'une courte période (entre 6 et 8 séquences vidéo d'une durée de 5 minutes analysées par jour). Le nombre total d'abeilles capturées quotidiennement est donc bien supérieur. Si on considère une activité de prédation constante pendant 8 heures ce nombre peut être estimé à environ 200 abeilles par jour. Il est généralement considéré que la mortalité naturelle quotidienne des abeilles est comprise entre 400 et 1000 individus par jour au cours de la saison d'été (Gary 1960 ; Sakagami & Fukuda 1968 ; Porrini *et al.* 2002)

Une mortalité supplémentaire peut donc avoir des conséquences importantes, surtout en fin de saison, où les abeilles qui sont élevées sont destinées à vivre plusieurs mois pour assurer l'hivernage correct de la colonie, en particulier pour maintenir une température adéquate dans la colonie. Mais ces abeilles « d'hiver » sont également très importantes pour relancer l'élevage de nouvelles abeilles à la sortie de l'hivernage, gage de la survie de la colonie. Un trop grand nombre d'abeilles prélevées par le frelon pourra donc avoir des conséquences dramatiques pour la survie des colonies en hiver et juste après. C'est d'ailleurs ce que confirment les nombreux témoignages d'apiculteurs relatés par les journaux apicoles, et que nous avons également nous-mêmes relevés en les interrogeant sur le terrain et par l'intermédiaire d'un questionnaire adapté.

Cet effort de défense ainsi que le nombre d'abeilles capturées a fortement affaibli les deux colonies, D2 et D3. La première est morte avant l'arrivée de l'hiver et la deuxième est morte au cours de l'hiver.

Il est à noter que nos analyses ont été réalisées en l'absence de colonies témoins qui auraient pu nous permettre des comparaisons avec des colonies non soumises aux attaques des frelons dans le même écosystème et aux mêmes périodes. Mais, il n'est

guère possible aujourd'hui dans cette région du sud-ouest, de trouver de telles colonies, même si la pression de prédation est variable d'un rucher à un autre.

Pour conforter nos hypothèses, il serait aussi nécessaire d'obtenir des données sur la floraison et la disponibilité de nourriture (pollen et nectar) pour les abeilles, autre facteur qui influence fortement l'activité des colonies d'abeilles.

En conclusion, les données obtenues sur ces deux ruches suggèrent que les colonies d'abeilles présentes en France (ici la sous-espèce *A. m. mellifera*) ne semblent pas capables, à l'heure actuelle, de lutter efficacement contre le frelon *V. velutina*, contrairement à ce qui a été montré pour d'autres sous-espèces d'abeilles attaquées par des frelons.

Le seul comportement de défense induit par la pression de prédation du frelon consisterait en une accumulation d'abeilles gardiennes sur la planche d'envol afin de bloquer l'entrée du frelon dans la ruche.

Par ailleurs, l'impact de *V. velutina* sur les ruchers n'est pas dû seulement aux abeilles qu'il prélève mais aussi à sa présence permanente devant les ruches, qui entraîne un arrêt de l'activité de butinage. Si ses réserves de miel deviennent insuffisantes, la colonie d'abeilles peut mourir de malnutrition au cours de l'hiver suivant.

Nos données confortent les nombreux témoignages de terrain sur l'affaiblissement des colonies d'abeilles et leur surmortalité dus aux attaques de *V. velutina*. Elles apportent des informations importantes sur le rôle joué dans cette surmortalité par l'effet direct de la capture des abeilles par les frelons, et l'effet indirect de la présence de ces derniers sur la diminution de l'activité de butinage ; ces deux facteurs s'additionnant.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les invasions biologiques offrent des opportunités uniques de connaissance des processus écologiques et évolutifs se produisant à des échelles spatiales et temporelles larges ; processus qu'il ne serait pas possible d'étudier dans des conditions classiques d'expérimentation pour des raisons éthiques ou logistiques (Sax *et al.* 2007). La biologie de l'invasion fournit ainsi un cadre d'étude de processus populationnels (démographiques, adaptatifs, évolutifs) en cours, cette approche étant plus complexe à entreprendre chez des espèces locales ayant atteint un relatif équilibre avec leur environnement.

Au cours de ma thèse, j'ai tenté d'apporter des éléments de réponse pour chacune des étapes clés de l'invasion biologique du frelon à pattes jaunes, *V. velutina* en France : son origine géographique, son introduction, son établissement, sa prolifération et son impact sur une des espèces proies : l'abeille domestique *A. mellifera*. L'ensemble de ce travail a été réalisé grâce à une étude transversale qui s'est appuyé à la fois sur les concepts et outils de la génétique des populations, dans ses déclinaisons analytiques les plus récentes dans le champ de l'étude des espèces envahissantes, et sur l'écologie comportementale, au travers d'une approche mêlant observations automatisées à distance et expérimentations sur le terrain.

Dans ce cadre, la génétique de l'invasion s'est avérée être un outil pertinent pour l'étude des facteurs historiques et évolutifs qui peuvent avoir favorisé l'établissement et l'expansion de l'espèce en France. En particulier, l'étude du taux de polymorphisme des marqueurs génétiques nous a permis d'inférer des paramètres démographiques clés, tel que le nombre d'avènements d'introduction et l'estimation de la taille des propagules, l'identification de l'aire d'origine et de la route d'invasion, et d'apporter des informations pertinentes sur les premières étapes de l'établissement de l'espèce et sur les processus évolutifs associés.

La caractérisation génétique des populations de *V. velutina* a permis de démontrer que la population envahissante est issue d'une zone d'origine unique (la région chinoise située à cheval entre les provinces de Zhejiang et Jiangsu). L'hypothèse selon laquelle *V. velutina* aurait été introduit par bateau lors de transport de poteries chinoises entre

Yixing et la France autour de l'année 2004 semble donc tout à fait plausible d'un point de vue génétique. Par ailleurs, l'estimation de l'effectif efficace de la population introduite suggère que la population française résulterait de l'introduction d'une seule femelle, fécondée par plusieurs mâles. Le nombre de générations écoulées depuis l'introduction ont été estimées entre 7 et 10.

Une réduction de variabilité génétique est généralement considérée comme une contrainte pour le potentiel adaptatif des espèces confrontées à des environnements nouveaux (Allendorf & Lundquist 2003). L'apparente perte de diversité génétique chez *V. velutina* lors de son introduction en France n'a visiblement pas contraint le succès de son invasion. Nous avons essayé de comprendre quels étaient les mécanismes biologiques explicatifs. Nous avons donc entrepris une caractérisation génétique des colonies de la lignée envahissante. Cette étude nous a permis d'apporter des informations pertinentes sur le système d'accouplement de l'espèce. La constatation que plusieurs lignées paternelles étaient présentes dans la population de *V. velutina* établie en France, nous a permis de suggérer que la polyandrie pourrait avoir significativement contribué au succès de l'invasion en permettant à l'espèce de surmonter certains des facteurs potentiellement négatifs associés au processus invasif. En particulier, l'existence d'une polyandrie chez *V. velutina* aurait accru la diversité génétique de la descendance et par conséquent aurait augmenté les capacités de survie de l'espèce et son adaptabilité vis-à-vis de l'environnement de la zone envahie.

En dépit de la présence de mâles diploïdes, la population de *V. velutina* se maintient en France et s'étend dans les pays limitrophes (Espagne, Belgique) ainsi qu'au Portugal. Nous avons avancé l'hypothèse que la polyandrie, rare au sein des Vespidae, aurait été favorisée face aux risques d'effondrement de populations consécutifs à la production de mâles diploïdes stériles (Page 1986). Chez *A. mellifera* Tarpy & Page (2001) ont montré par la modélisation mathématique qu'un grand nombre d'accouplements diminue le risque de mortalité élevée due à l'émergence de mâles diploïdes au sein du couvain.

Les effets négatif de la consanguinité pourraient aussi avoir été réduits par l'haplodiploïdie, en raison de la purge allèles récessifs délétères au cours du stade haploïde (mâle) que ce système de reproduction permet (Crozier 1985 ; Werren 1993; Gerloff & Schmid-Hempel 2005).

Un autre facteur susceptible d'avoir favorisé l'établissement et la prolifération de l'espèce en France est sans doute la large disponibilité en ressources du fait de la grande abondance d'une de ses proies de prédilection : l'abeille domestique. Souvent l'absence de co-évolution entre un prédateur introduit et les espèces proies autochtones peut engendrer une prédation exacerbée (Short *et al.* 2002) et une prolifération de l'espèce introduite en dépit d'un déclin drastique de nombreuses espèces autochtones (Williamson 1996).

La pression de prédation que *V. velutina* exerce sur les colonies d'abeille domestique et les graves conséquences écologiques et socio-économiques de l'irruption de ce nouveau facteur de perturbation de l'apiculture européenne m'a conduit à développer un très large volet d'observations et d'expérimentations. Mon objectif était d'évaluer si les populations françaises de l'abeille domestique étaient ou non capables de développer un comportement de défense efficace vis-à-vis du nouveau prédateur et, parallèlement, de mieux estimer l'incidence de *V. velutina* sur la dynamique annuelle des colonies d'abeilles, afin de mieux comprendre son succès invasif et de préciser son impact. Les résultats obtenus montrent que si l'abeille domestique est capable de développer une stratégie de réponse aux attaques de frelon, via la constitution d'un « mur d'abeilles » sur la planche d'envol empêchant ce dernier de pénétrer dans la ruche, cette stratégie ne permet pas aux abeilles de diminuer la pression de prédation. Le nombre de frelon tués est négligeable. De plus, cet effort de défense mobilise l'essentiel des butineuses qui ne peuvent plus assurer l'accumulation de réserves et n'empêche pas qu'un grand nombre d'abeilles soit capturée. La concomitance de ces deux facteurs peut entraîner la disparition des colonies en période hivernale. Les suivis vidéo automatisés de l'activité des abeilles et de la prédation des frelons confirment les déductions issues des expérimentations précédentes :

- la mobilisation des abeilles pour protéger la ruche est concomitante de la présence des frelons et se fait au détriment de l'activité de butinage des ouvrières ;
- la pression de prédation des frelons, maintenue au cours de l'automne, est importante et augmente significativement la mortalité des colonies d'abeilles, mettant celles-ci en péril à l'entrée de l'hiver.

Ces résultats soulignent la gravité de l'invasion de *V. velutina* en France et conduisent à s'interroger, comme nous le feront plus avant, sur les méthodes à utiliser pour en limiter l'expansion.

Au terme de la présente étude, on peut tenter de procéder à une synthèse des connaissances et hypothèses dont on dispose quant aux différents facteurs qui ont pu jouer un rôle dans le succès de l'invasion du frelon asiatique. On distinguera classiquement des facteurs extrinsèques et des facteurs (traits de vie) propres au frelon :

Facteurs extrinsèques

- Facteurs climatiques et environnementaux: la comparaison des niches climatiques entre la zone de distribution naturelle de ce frelon asiatique et les zones d'invasion a permis de démontrer que la totalité du territoire français ainsi que la plupart des pays d'Europe présentent des conditions environnementales favorables à la survie et l'établissement de *V. velutina* (Villemant *et al.* 2011a).
- Absence de compétiteurs (*Enemy release hypothesis 1*) : lorsqu'une espèce est introduite, les relations interspécifiques avec les espèces autochtones peuvent être limitantes (Sakai *et al.* 2001). Le frelon à pattes jaunes a aussi vraisemblablement bénéficié de la quasi absence de compétiteurs potentiels et de la faible pression de compétition exercée par son compétiteur direct, le frelon européen *V. crabro*. La comparaison du patron d'invasion entre France et Corée où le frelon a été également introduit vient appuyer cette hypothèse : dans les années 2000, elle a été introduite en France mais aussi en Corée (Kim *et al.* 2006), où son expansion est toutefois limitée (Jung *et al.* 2008). Elle est en effet confrontée en Corée aux six espèces de frelons locales alors qu'en France une seule espèce, le frelon d'Europe *V. crabro*, est présente (Villemant *et al.* 2011a).
- Absence de prédateurs et parasites (*Enemy release hypothesis 2*) : *V. velutina* n'a probablement pas été introduit avec son cortège spécifique de prédateurs

et parasites, susceptibles d'attaquer les frelons dans l'aire d'origine de l'espèce. L'absence, ou la faible pression exercée par des prédateurs locaux spécialisés a probablement joué aussi un rôle dans le succès de l'invasion. L'INPN (http://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/433589/tab/fiche) indique que la Pie-grièche écorcheur (*Lanius collurio*), la Bondrée apivore (*Pernis apivorus*) ou le Guépier d'Europe (*Merops apiaster*), qui sont d'actifs prédateurs du frelon d'Europe, sont susceptibles de s'attaquer aussi aux adultes du frelon asiatique, mais aucune donnée quantitative ne semble exister à ce niveau et nous n'avons pas observé de tels cas de prédation lors de nos observations de terrain. L'INPN indique aussi que des Pics (*Picus spp.*) ainsi que des Pies (*Pica pica*) ont été vus à la fin de l'automne perforer à coups de bec l'enveloppe d'un nid pour consommer les derniers individus, larves ou adultes, de la colonie de frelons en train de mourir.

- Abondance de ressources: *V. velutina* a sans doute bénéficié d'une large disponibilité en ressources : la France comptait 1 360 973 en 2004 (Rapport AFFSA 2008). En plus, il est un prédateur opportuniste et son régime alimentaire peut varier selon le type d'habitat exploité (Muller *et al.* 2009).
- Absence de comportement de défense efficace des colonies d'abeilles en France. Comme on l'a vu plus haut, les colonies françaises d'*A. mellifera*, qui n'ont pas co-évolué avec le frelon asiatique et qui ne sont pas soumises à une prédation d'ampleur similaire de la part de *V. crabro*, ne présentent pas une stratégie efficace de défense contre *V. velutina*. Le comportement qu'elles développent limite l'entrée éventuelle des frelons dans la ruche mais ne diminue pas la pression de prédation.
- Absence de méthode de lutte efficace et sélective, aspect que je développerai dans la suite de la conclusion.
- Absence de barrière physique à l'introduction. L'accroissement des échanges économiques entre la zone d'origine et la France a certainement facilité l'introduction. Nous avons vu que nos résultats étaient en accord avec l'hypothèse d'une introduction via l'importation de poteries destinées à

l'élaboration de bonzaïs. –Le frelon asiatique est présent dans la zone de production de ces poteries chinoises.

Facteurs intrinsèques

Le frelon à pattes jaunes présente plusieurs traits de vie que l'on retrouve chez plusieurs espèces envahissantes, notamment chez les Hyménoptères :

- Haplodiploïdie : comme on l'a vu plus avant, ce mode de reproduction peut avoir une action de sélection purificatrice des allèles délétères sur les génotypes mâles hémizygotes.
- Polyandrie : Nous avons vu que ce trait de vie pouvait permettre aux espèces polyandres de surmonter certaines conséquences d'un processus invasif, en particulier limiter la perte de diversité génétique associée au goulot d'étranglement démographique qui caractérise souvent un phénomène invasif.
- Effet conjugué de l'haplodiploïdie et de la polyandrie : ce sont ces effets conjugués qui expliquent qu'une seule femelle polyandre a pu initier la population qui a envahi le 50% du territoire français.
- Grande capacités reproductrices : la polyandrie et le grand nombre d'individus produit par colonie (jusqu'à 15 000) ont permis une croissance rapide de la population.
- Spécialisation trophique : Il semble que *V. velutina*, tout en étant susceptible de consommer d'autres arthropodes, présente une préférence pour l'abeille domestique. Cette préférence peut être plus apparente que réelle, le frelon exploitant la ressource qui est à la fois la plus abondante et qui demande le moins d'investissement dans sa recherche et sa capture.
- Stratégie de prédation : Le frelon présente une stratégie de prédation très efficace qui lui permet de prélever une proportion significative des abeilles d'une colonie.
- Capacité de dispersion : L'expansion régionale spectaculaire de cette espèce en seulement un maximum de 10 générations depuis l'introduction peut s'expliquer par les capacités de vol importantes des fondatrices (soit entre 15 et 40 km en une journée) (Villemant *et al.* 2011b). Au contraire l'invasion de

départements français et de localités situés loin du front d'invasion (Belgique, Portugal, Côte d'Or, Ile de France) peut être dû à une dispersion passive des individus (transportés par l'homme). Toutefois pour confirmer cette hypothèse il faudrait analyser les individus récemment trouvés au Portugal et s'assurer que ne dérivent pas d'une nouvelle introduction depuis l'Asie.

- Caractère cryptique des femelles hibernantes et des nids. Les femelles hibernantes passent l'hiver cachées dans des abris et sont donc difficiles à détecter. Ce caractère cryptique a pu aussi faciliter leur transport d'un continent à l'autre. Si la taille des nids de frelon en fin de saison est impressionnante, il n'en va pas de même au sortir de l'hiver d'autant que leur positionnement, souvent au sommet d'un grands arbre, rend leur détection difficile.

Il est rare de pouvoir, pour une espèce envahissante, faire la liste d'un aussi grand nombre de facteurs complémentaires réellement susceptibles d'avoir permis et facilité une invasion.

Quelques perspectives appliquées sur la gestion des populations de V. velutina.

Le frelon à pattes jaunes s'est établi avec succès en France, et la plupart des pays d'Europe ont un risque non négligeable de voir ce frelon d'Asie s'y acclimater (Villemant *et al.* 2011). Le frelon asiatique apparait donc comme une menace pour l'apiculture européenne et représente un facteur supplémentaire de déclin des colonies d'abeilles déjà fragilisées par varroa, les maladies virales ou les pesticides (Jourdain 2010).

La question de la lutte anti-frelon à pattes jaunes est donc une question de grande actualité. Actuellement, le piégeage est utilisé de manière intensive par les apiculteurs, qui assistant, impuissants, à l'attaque de leurs colonies et aux nombreuses mortalités qu'elles engendrent, et essayent, comme il est compréhensible, de maîtriser l'extension de l'invasion et de réduire la pression sur leurs ruchers. Toutefois, l'utilisation actuelle de systèmes de piégeage se caractérise généralement par l'absence d'une gestion

raisonnée qui est à l'origine d'impacts sur des espèces non-cibles (Rome *et al.* 2011). L'impact sur la biodiversité d'un piégeage intensif peut donc être important. Une réflexion approfondie sur les moyens de contrôle de l'espèce s'avère donc nécessaire. Les résultats de génétique des populations obtenus dans ce travail fournissent quelques éléments de réponse.

On distingue classiquement trois types de lutte contre les invasions biologiques : les méthodes préventives de quarantaine, l'éradication et les méthodes de contrôles. Ces différentes méthodes ne peuvent pas toutes être envisagées pour *V. velutina*.

Les contrôles de quarantaine visant à prévenir les nouvelles introductions d'espèces envahissantes sont essentielles contre leur propagation. Différents travaux montrent que les bénéfices économiques attendus d'une politique de contrôle de quarantaine sont très importants (Leung *et al.* 2002 ; Keller *et al.* 2007). D'une manière générale, ces contrôles sont essentiels non seulement pour éviter le départ de propagules vers d'autres zones, mais ils sont également nécessaires pour éviter des introductions multiples. En effet, ces introductions multiples peuvent être à l'origine de l'augmentation de potentiel évolutif de l'espèce envahissante, par l'hybridation et introgression génétique entre différentes populations (Ellstrand & Schierenbeck 2000 ; Facon *et al.* 2006 ; Kelly *et al.* 2006 ; Kelly *et al.* 2006 ; Lombaert *et al.* 2010). Dans le cas de *V. velutina*, l'étude génétique conduite au cours de cette thèse a permis de montrer que l'introduction d'une seule reine peut générer une invasion à grande échelle ; la détection rapide dans le port d'entrée semblerait donc être la meilleure façon de prévenir une nouvelle infestation ou l'introduction de nouvelles propagules. Toutefois, une telle pratique visant à contrôler une introduction de l'espèce représente un défi majeur pour le frelon d'Asie : une seule fondatrice échappée peut rendre ces actions de gestion inefficaces. De plus la petite taille et la crypticité des femelles hibernantes rendraient difficile une détection de ces dernières et faciliterait leur transport sur de longues distances.

Si l'éradication des espèces envahissantes est la méthode préconisée par l'IUCN (2000) et dans la Convention sur la Diversité biologique (article 8), cette solution semble impossible dans le cas du frelon à pattes jaunes. En effet, l'espèce s'avère être bien implantée en France et en pleine expansion, et la généralisation de piégeages de

fondatrices au printemps pour éviter la constitution de nouvelles colonies, apparaît comme une approche pas suffisamment exhaustive pour être couronnée de succès ; il est en effet probable que certaines femelles ne soient jamais capturées (chaque nid peut produire jusqu'à 500 reines (Rome *et al.* 2011)). L'étude génétique conduit au cours de cette thèse montre que la persistance d'une ou quelques fondatrices peut suffire à faire échouer les tentatives d'éradication de l'espèce. Cette méthode s'est déjà avérée inefficace au cours d'expérimentations de lutte réalisées en Nouvelle Zélande contre des guêpes invasives (Thomas 1960, Beggs *et al.* 2011). De plus, l'absence de pièges spécifiques et la capture d'un grand nombre d'insectes non cibles pourrait perturber l'équilibre environnemental (Rome *et al.* 2011). D'autres solutions doivent donc être envisagées pour limiter les populations de cet insecte.

Un moyen de lutte potentiellement plus efficace est la destruction de nids actifs avant la production des sexuées (avant fin octobre) (Villemant *et al.* 2011). La mise à point d'une technique de détection de nids sur le terrain avec des puces RFID pourrait constituer une solution (recherche de l'IRBI de Tours).

Dans le court terme, pour qu'un piège soit réellement efficace et puisse réduire la pression de prédation que le frelon exerce sur les colonies Pour qu'un piège soit réellement efficace, il faudrait que l'appât utilisé soit attractif pour le frelon asiatique, répulsif pour les autres insectes et durable dans le temps. La recherche de méthodes de piégeage sélectif par phéromone est en cours (recherche de l'INRA de Bordeaux) et les résultats sont encourageants. L'étude du système olfactif et neuronal du frelon, qui fait l'objet d'une thèse au laboratoire CNRS-LEGS, devrait permettre d'isoler les composés chimiques impliqués dans les comportements sexuels ou de prédation du frelon et d'apporter des informations importantes pour mieux lutter contre cette espèce envahissante.

Même si peu de pistes existent pour envisager un contrôle biologique du frelon asiatique, un accroissement des connaissances sur le rôle des prédateurs potentiels présents en Europe est souhaitable. Une collaboration avec les scientifiques chinois en vue de recherche d'éventuels agents pathogènes, parasites de couvain ou parasitoïdes serait souhaitable en accompagnant une telle démarche de toutes les précautions

nécessaires de manière à éviter l'introduction d'un auxiliaire qui se révèle nuisible à d'autres espèces autochtones.

PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de mon doctorat de recherche ont permis d'acquérir des informations importantes sur les principaux traits biologiques du frelon asiatique, *V. velutina*, espèce mal connue dans son aire d'origine. Aujourd'hui des questions restent en suspend et des études complémentaires seront nécessaire pour éclaircir différents points.

Plusieurs travaux se sont intéressés aux facteurs biologiques pouvant expliquer le succès invasif des insectes sociaux. Ainsi, l'introduction des ces insectes sociaux dans un nouvel environnement a souvent été associé à un changement dans le système de reproduction et la structure sociale (Chapman & Bourke 2001). Nous avons démontré que la stratégie de reproduction de *V. velutina* a joué un rôle déterminant dans le succès de son établissement en France et sa prolifération.

Un des premiers travaux à mener en complément de la présente étude serait de s'intéresser à l'organisation sociale des populations de la zone d'origine et de comparer cette organisation à celle observée en France afin de déterminer si un changement d'organisation sociale entre populations introduites et autochtones a eu lieu à la suite de l'introduction. Cette étude pourrait se faire rapidement puisque des collectes dans la province chinoise du Zhejiang ont été récemment réalisées grâce à une mission d'échantillonnage conduite par Alain Roques (INRA d'Orléans).

En outre afin de pouvoir mieux comprendre quelles sont les bases biologiques qui ont permis ce succès invasif, il serait intéressant d'étudier l'incidence à moyen et long termes de la présence de mâles diploïdes et du goulot d'étranglement sur la dynamique de la population de *V. velutina* dans la zone d'invasion. Dans ce sens, une compréhension plus quantitative de la façon dont chacun des traits de vie de l'espèce a affecté les processus d'invasion est nécessaire. A cet effet, il pourrait être intéressant de comparer la variance génétique additive (AGV), qui correspond à la variance génétique due aux effets additifs de tous les allèles des loci impliqués sur le trait phénotypique et donc à la

fraction de variabilité génétique effectivement transmise à la descendance (Bossdorf *et al.* 2005; Leinonen *et al.* 2007), entre la zone d'origine et la zone envahie.

En ce qui concerne les interactions entre le frelon et sa ressources trophiques principale, les colonies d'abeilles, il sera nécessaire i) de mieux quantifier l'incidence de la prédation sur les colonies d'abeilles et ii) d'étendre les études comportementales déjà réalisées afin d'évaluer les comportements de défense des différentes races d'abeilles utilisées en France. A plus long terme, un suivi sur plusieurs années de différentes colonies d'une même sous-espèce devrait permettre de déceler d'éventuels changements dans la stratégie de défense des abeilles. Il est vraisemblable que le caractère « capacité de défense » sera pris en compte à l'avenir dans les plans d'amélioration génétique de l'abeille domestique.

Des telles études permettraient d'apporter un complément intéressant au travail réalisé lors de ma thèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(hors références citées dans les articles)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, K. L. (2005). Supercolonies of the invasive yellow crazy ant, *Anoplolepis gracilipes*, on an oceanic island: Forager activity patterns, density and biomass. *Insectes Sociaux*, 52(3), 266-273.
- Akre, R. D., & Davis, H. (1978). Biology and pest status of venomous wasps. *Annual review of entomology*, 23(1), 215-238.
- Allendorf, F. W., & Lundquist, L. L. (2003). Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology*, 17(1), 24-30.
- Andrison, D. (1996). The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology*, 45(6), 1027-1035.
- Arnqvist, G., & Nilsson, T. (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal behaviour*, 60(2), 145-164.
- Baracchi, D., Cusseau, G., Pradella, D., & Turillazzi, S. (2010). Defence reactions of *Apis mellifera ligustica* against attacks from the European hornet *Vespa crabro*. *Ethology Ecology & Evolution*, 22(3), 281-294.
- Beaumont, Mark A. (2010). Approximate Bayesian Computation in Evolution and Ecology. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 41(1), 379-406.
- Beaumont, Mark A, Zhang, W., & Balding, D. J. (2002). Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, 162(4), 2025-2035.
- Beggs, J. R., Brockerhoff, E. G., Corley, J. C., Kenis, M., Masciocchi, M., Muller, F., Rome, Q., et al. (2011). Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. *BioControl*, 56(4), 505-526.
- Bertorelle, G., Benazzo, a, & Mona, S. (2010). ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular ecology*, 19(13), 2609-25.

- Blumenthal, D. M. (2006). Interactions between resource availability and enemy release in plant invasion. *Ecology Letters*, 9(7), 887-895.
- Bonhomme, M., Blancher, A., Cuartero, S., Chikhi, L., & Crouau-Roy, B. (2008). Origin and number of founders in an introduced insular primate: estimation from nuclear genetic data. *Molecular ecology*, 17(4), 1009-19.
- Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L., Rogers, W. E., Siemann, E., & Prati, D. (2005). Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*, 144(1), 1-11.
- Bourke, A. F. G., & Franks, N. R. (1995). *Social Evolution in Ants*. (J. R. Krebs & T. H. Clutton-Brock, Eds.) *Ethology* (Vol. 104, p. 529). Princeton University Press.
- Burel, F., Baudry, J., Butet, A., Clergeau, P., Delettire, Y., Le Coeur, D., Dubs, F., Morvan, N., Paillat, G., Petit, S., et al. (1998) Comparative biodiversity along a gradient of agricultural landscapes. *Acta Oecologica*, 19(1), 47-60.
- Butler CG (1974) *The World of the Honey Bee*. London: Collins
- Buttermore, R. E. (1997). Observations of Successful *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) Colonies in Southern Tasmania. *Australian Journal of Entomology*, 36(3), 251-254.
- Byers, J. E., Reichard, S., Randall, J. M., Parker, I. M., Smith, C. S., Lonsdale, W. M., Atkinson, I. A. E., et al. (2002). Directing Research to Reduce the Impacts of Nonindigenous Species. *Conservation Biology*, 16(3), 630-640.
- Cabe, P. R. (1998). The effects of founding bottlenecks on genetic variation in the European starling (*Sturnus vulgaris*) in North America. *Heredity*, 80(June 1997), 519-525.
- Caldera, E. J., Ross, K. G., DeHeer, C. J., & Shoemaker, D. D. (2008). Putative native source of the invasive fire ant *Solenopsis invicta* in the USA. *Biological Invasions*, 10(8), 1457-1479.

- Carpenter J.M. & Kojima J. (1997) Checklist of the species in the subfamily Vespinae (Insecta: Hymenoptera: Vespidae). *Natural history bulletin of Ibaraki University* 1: 51-92.
- Carpenter, J.M., Dvorák, L., Kojima, J. I., Nguyen, L. T. P., Perrard, A., & Pickett, K. M. (2011). Taxonomic Notes on the Vespinae of Yunnan (Hymenoptera: Vespidae). *American Museum Novitates*, 3709(3709), 1-10.
- Carton Y., Sorensen C., Smith J. & Smith E. (2007) Une coopération exemplaire entre entomologistes français et américains pendant la crise du *Phylloxera* en France (1868-1895). *Annales de la Société Entomologique de France* Nouvelle série 43: 103-125.
- Casiraghi, M., Bordenstein, S. R., Baldo, L., Lo, N., Beninati, T., Wernegreen, J. J., Werren, J. H., et al. (2005). Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on gltA, groEL and ftsZ gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 151(Pt 12), 4015-4022.
- Castro L. & Pagola-Carte S. (2010). *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae), recolectada en la Península Ibérica. *Heteropterus Revista de Entomología*(10): 193-196
- Causton, C. E., Peck, S. B., Sinclair, B. J., Roque-Albelo, L., Hodgson, C. J., & Landry, B. (2006). Alien insects: Threats and implications for conservation of Galápagos Islands. *Annals of the Entomological Society of America*, 99(1), 121-143.
- Chapman, R. E., & Bourke, A. F. G. (2001). The influence of sociality on the conservation biology of social insects. *Ecology Letters*, 4, 650-662.
- Chapuis, J. (1994). Alien mammals, impact and management in the French subantarctic islands. *Biological Conservation*, 67(2), 97-104.
- Choi M.B., Martin S.J., Lee J.W. (2011) Distribution, spread and impact of the invasive hornet *Vespa velutina* in South Korea. *Entomological Research* 41 : 276.
- Clément H., Barbançon J-M, et al. (2006) Traité Rustica de l'apiculture. RUSTICA.

- Colautti, R. I., Ricciardi, A., Grigorovich, I. A., & MacIsaac, H. J. (2004). Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters*, 7(8), 721-733.
- Cole BJ (1983) Multiple mating and the evolution of social behaviour in the Hymenoptera. *Behav Ecol Sociobiol* 12:191-201
- Cook, J. M., & Crozier, R. H. (1995). Sex determination and population biology in the hymenoptera. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(7), 281-286.
- Courchamp, F., Chapuis, J.-L., & Pascal, M. (2003). Mammal invaders on islands: impact, control and control impact. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 78(3), 347-383.
- Cox, G. W. (2004). Alien species and evolution: the evolutionary ecology of exotic plant. *Journal of Ecology* (Vol. 86, p. 377). Island Press.
- Cremer, S., Ugelvig, L. V., Drijfhout, F. P., Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Hughes, D. P., et al. (2008). The Evolution of Invasiveness in Garden Ants. (E. I. Svensson, Ed.) *PLoS ONE*, 3(12), 9.
- Crozier, R. H., & Page, R. E. (1985). On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 18(2), 105-115.
- Csilléry, K., Blum, M. G. B., Gaggiotti, O. E., & François, O. (2010). Approximate Bayesian Computation (ABC) in practice. *Trends in ecology & evolution*, 25(7), 410-8.
- Daisie. (2009). Handbook of Alien Species in Europe. *Ecology*, 3, 133-263. Springer
- Davidson, D. W. (1998). Resource discovery versus resource domination in ants: a functional mechanism for breaking the trade-off. *Ecological Entomology*, 23(4), 484-490.
- Davies, N., Villablanca, F. X., & Roderick, G. K. (1999). Bioinvasions of the medfly *Ceratitis capitata*: source estimation using DNA sequences at multiple intron loci. *Genetics*, 153(1), 351-360.
- de Haro, L., Labadie, M., Chanseau, P., Cabot, C., Blanc-Brisset, I., & Penouil, F. (2009). Medical consequences of the Asian black hornet (*Vespa velutina*) invasion in

- Southwestern France. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 55(2-3), 650-2.
- Dlugosch, K. M., & Parker, I. M. (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular ecology*, 17(1), 431-49.
- Donovan B.J., Howie A.M.E., Schroeder N.C., Wallace A.R. and Read P.E.C. (1992). Comparative Characteristics of Nests of *Vespula-Germanica* (F) and *Vespula-Vulgaris* (L) (Hymenoptera, Vespinae) from Christchurch-City, New-Zealand. *N. Z. J. Zool.* 19: 61-71.
- Downie, D. A. (2002). Locating the sources of an invasive pest, grape *phylloxera*, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology*, 11(10), 2013-2026.
- Dowton, M., & Austin, A. D. (2002). Increased congruence does not necessarily indicate increased phylogenetic accuracy--the behavior of the incongruence length difference test in mixed-model analyses. *Systematic Biology*, 51(1), 19-31.
- Drescher, J., Blüthgen, N. & Feldhaar, H. (2007) Population structure and intraspecific aggression in the invasive ant species *Anoplolepis gracilipes* in Malaysian Borneo. *Molecular ecology*, 16:1453-65.
- Dvorak, L. (2006). Oriental Hornet *Vespa orientalis* Linnaeus, 1771 found in Mexico (Hymenoptera, Vespidae, Vespinae). *Entomological Problems*, 36(1), 80.
- Edwards R (1980) Social wasps : their biology and control. Rentokil, East Grinstead
- Ehler, L. E. (1998). Invasion biology and biological control. *Biological Control*, 13(2), 127-133.
- Ellstrand, N. C., & Schierenbeck, K. A. (2000). Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7043-7050.
- Estoup, A., & Guillemaud, T. (2010). Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular ecology*, 4113-4130.

- Facon, B., Genton, B. J., Shykoff, J., Jarne, P., Estoup, A., & David, P. (2006). A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in ecology & evolution*, 21(3), 130-5.
- Facon, B., Hufbauer, R. A., Tayeh, A., Loiseau, A., Lombaert, E., Vitalis, R., Guillemaud, T., et al. (2011). Inbreeding Depression Is Purged in the Invasive Insect *Harmonia axyridis*. *Current Biology*, 21(5), 424-427.
- Fenner F. and Fantini B. (1999) Biological control of vertebrate pests: the history of *Myxomatosis*. In: An experiment in Evolution. pp. CABI Publishing, Oxford.
- Foley, J. A., Defries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., Chapin, F. S., et al. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), 570-4.
- Fonseca, D. M., LaPointe, D. A., & Fleischer, R. C. (2000). Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. *Molecular Ecology*, 9(11), 1803-1814.
- Fordyce, J. A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 209(Pt 12), 2377-2383.
- Foster KR, Seppä P, et al. (1999). Low paternity in the hornet *Vespa crabro* indicates that multiple mating by queens is derived in vespine wasps. *Behavioral ecology and sociobiology* 46(4): 252
- Fournier, D., Estoup, A., Orivel, J., Foucaud, J., Jourdan, H., Le Breton, J. & Keller, L. (2005) Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature*, 435, 1230–1234.
- Fournier D, De Biseau J-C, et al. (2009). Genetics, behaviour and chemical recognition of the invading ant *Pheidole megacephala*. *Molecular Ecology* 18(2): 186-199.
- Frankham R (2005). Invasion biology - Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity* 94(4): 385-385.

- Fritts, T. H., & Rodda, G. H. (1998). The role of introduced species in the degradation of island ecosystems: A case history of Guam. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 113-140.
- Gary (1960). A trap to quantitatively recover dead and abnormal honeybees from the hive. *J Econ. Entomol.*, 53: 782-785.
- Gelbard, J. L., and Belnap, J. (2003). Roads as conduits for exotic plant invasions in a semiarid landscape. *Conservation Biology* 17:420-432.
- Genovesi, P. (2004). The European Strategy on Invasive Alien Species. *Naturopa*, 101.
- Genton, B. J., Shykoff, J. A., & Giraud, T. (2005). High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*, 14(14), 4275-85.
- Gerloff, C. U. and Schmid-Hempel, P. (2005) Inbreeding depression and family variation in a social insect, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Oikos*, 1, 67-80.
- Giraud, T., Pedersen, J.S. & Keller, L. (2002) Evolution of supercolonies: the Argentine ants of southern Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 6075-9.
- Grevstad FS (1999) Experimental invasions using biological control introductions: the influence of release size on the chance of population establishment. *Biological Invasions* 1: 313-323.
- Grimaldi, D. A. (1997). New and rediscovered primitive ants (Hymenoptera, Formicidae) in Cretaceous amber from New Jersey, and their phylogenetic relationships. *American Museum Novitates*, 3208(3208), 1-43.
- Grosso-Silva, J.M., Maia, M. (2012). *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Vespidae), new species for Portugal. *Arquivos Entomológicos*, 6 :53-54.
- Guillemaud, T., Beaumont, M. A., Ciosi, M., Cornuet, J.-M., & Estoup, A. (2010). Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity*, 104(1), 88-99.

- Gurnell, J., Wauters, L. A., Lurz, P. W. W., & Tosi, G. (2004). Alien species and interspecific competition: effects of introduced eastern grey squirrels on red squirrel population dynamics. *Journal of Animal Ecology*, 73(1), 26-35.
- Gwiazdowski, R., Vandriesche, R., Desnoyers, A., Lyon, S., Wu, S., Kamata, N., & Normark, B. (2006). Possible geographic origin of beech scale, *Cryptococcus fagisuga* (Hemiptera: Eriococcidae), an invasive pest in North America. *Biological Control*, 39(1), 9-18.
- Hamilton WD (1987) Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution. In: *Animal Societies, Theories and Facts* (eds ItôY, Brown JL, Kikkawa J), pp. 81–102. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Harris RJ, Oliver EH (1993) Prey diets and population densities of the wasps *Vespula vulgaris* and *V. germanica* in scrubland-pasture. *New Zealand Journal of Ecology*, 17, 5–12.
- Haxaire J, Bouguet J-P, et al. (2006). *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune française (Hym., Vespidae). *Bulletin de la Société entomologique de France* 111(2): 194
- Hee, J. J., Holway, D. a., Suarez, A. V., & Case, T. J. (2000). Role of Propagule Size in the Success of Incipient Colonies of the Invasive Argentine Ant. *Conservation Biology*, 14(2), 559-563.
- Heimpel, G. E., de Boer, J. G., & Boer, J. G. D. (2008). Sex determination in the hymenoptera. *Annual review of entomology*, 53, 209-30.
- Helanterä H., Strassmann J.E., Carrillo J. and Queller D.C. 2009. Unicolonial ants: where do they come from, what are they and where are they going? *Trends Ecol. Evol.* 24: 341- 349.
- Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. (Bert Hölldobler & E. O. Wilson, Eds.) *Harvard University Press* (Vol. 1, p. 732).
- Holway, D. A., Lach, L., Suarez, A. V., Tsutsui, N. D., & Case, T. J. (2002). The causes and Consequences of Ant Invasions. (L Lach, C. Parr, & K. Abbott, Eds.) *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 181-233.

- Holway, D. A., & Suarez, A. V. (2004). Colony-structure variation and interspecific competitive ability in the invasive Argentine ant. *Oecologia*, 138(2), 216-222.
- Hopper, K. R., Roush, R. T., & Powell, W. (1993). Management of Genetics of Biological-Control Introductions. *Annual Review of Entomology*, 38(1), 27-51.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., & Stetter, K. O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 417(6884), 63-67.
- Hughes, W. O. H., Ratnieks, F. L. W., & Oldroyd, B. P. (2008). Multiple paternity or multiple queens: two routes to greater intracolony genetic diversity in the eusocial Hymenoptera. *Journal of evolutionary biology*, 21(4), 1090-5.
- IUCN The World Conservation Union. 2000. IUCN. Guidelines for the prevention of biodiversity loss due to biological invasion.
- Jennions, M. D., & Petrie, M. (2000). Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 75(1), 21-64.
- Jourdain D., 2010. Combattre les idées fausses sur le frelon asiatique. Document PDF téléchargeable sur le site de la DRAAF Aquitaine.
- Jung C, Kim DW, Lee HS, Baek H (2008) Some biological characteristics of a new honeybee pest, *Vespa velutina* nigrithorax Buysson 1905 (Hymenoptera: Vespidae). *Korean Journal of Apiculture*, 24, 61-65.
- Kaeuffer, R., Bonenfant, C., Chapuis, J.-L., & Devillard, S. (2009). Dynamics of an introduced population of mouflon *Ovis aries* on the sub-Antarctic archipelago of Kerguelen. *Ecography*, 33(June 2009), 435-442.
- Kastberger, G., Maurer, M., Weihmann, F., Ruether, M., Hoetzl, T., Kranner, I., & Bischof, H. (2011). Stereoscopic motion analysis in densely packed clusters: 3D analysis of the shimmering behaviour in Giant honey bees. *Frontiers in Zoology*, 8(1), 3.
- Kaufman, L. (1992). Catastrophic Change in Species-Rich Freshwater Ecosystems. *BioScience*, 42(11), 846.

- Keane, R. M., & Crawley, M. J. (2002). Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4), 164-170.
- Keller, R. P., Lodge, D. M., & Finnoff, D. C. (2007). Risk assessment for invasive species produces net bioeconomic benefits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 203-7.
- Keller, S. R., & Taylor, D. R. (2008). History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecology Letters*, 11(8), 852-866.
- Keller, L., & Waller, D. (2010). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(5), 230-241. Elsevier.
- Kelly, D. W., Muirhead, J. R., Heath, D. D., & Macisaac, H. J. (2006). Contrasting patterns in genetic diversity following multiple invasions of fresh and brackish waters. *Molecular Ecology*, 15(12), 3641-3653.
- Kim, J., & Choi, M. (2006). Occurrence of *Vespa velutina* Lepeletier from Korea, and a revised key for Korean *Vespa* species (Hymenoptera: Vespidae). *Entomological Research*, 36, 112 -115.
- Kolbe, J. J., Glor, R. E., Rodríguez Schettino, L., Lara, A. C., Larson, A., & Losos, J. B. (2004). Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, 431(7005), 177-81.
- Kowarik, I. (1995). Time lags in biological invasions with regard to the success and failure of alien species. In P. Pyšek, K. Prach, M. Rejmánek, & M. Wade (Eds.), *Plant invasions general aspects and special problems* (pp. 15-38).
- Krieger, M. J. B., Ross, K. G., Chang, C. W. Y., & Keller, L. (1999). Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Heredity*, 82(2), 142-150.
- Landolt, P. J., Sierra, J. M., Unruh, T. R., & Zack, R. S. (2010). A new species of *Vespula*, and first record of *Vespa crabro* L. (Hymenoptera: Vespidae) from Guatemala, Central America. *Zootaxa*, 68(May), 61-68.

- Leathwick DM, Godfrey PL (1996) Overwintering colonies of the common wasp (*Vespula vulgaris*) in Palmerston North, New Zealand. *N Z J Zool* 23:355–358.
- Le Breton J., Jourdan H., Chazeau J., Orivel J., Dejean A. (2005) Niche opportunity and ant invasion: the case of *Wasmannia auropunctata* in a New Caledonian rain forest, *J. Trop. Ecol.* 21, 93–98.
- Lee, C. E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(8), 386–391. Elsevier.
- Lee, V. S. Y., Tu, W.-C., Jinn, T.-R., Peng, C.-C., Lin, L.-J., & Tzen, J. T. C. (2007). Molecular cloning of the precursor polypeptide of mastoparan B and its putative processing enzyme, dipeptidyl peptidase IV, from the black-bellied hornet, *Vespa basalis*. *Insect Molecular Biology*, 16(2), 231-237.
- Leinonen, T., O'Hara, R. B., Cano, J. M., & Merilä, J. (2008). Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 1-17.
- Leung, B., Lodge, D. M., Finnoff, D., Shogren, J. F., Lewis, M. A., & Lamberti, G. (2002). An ounce of prevention or a pound of cure: bioeconomic risk analysis of invasive species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 269(1508), 2407-2413.
- Liebert, A., Gamboa, G., & Stamp, N. (2006). Genetics, behavior and ecology of a paper wasp invasion: *Polistes dominulus* in North America. *Annales Zoologici Fennici*, (December), 595-624.
- Liu, H., & Stiling, P. (2006). Testing the enemy release hypothesis: a review and meta-analysis. *Biological Invasions*, 8(7), 1535-1545.
- Lockwood, J. R., Roeder, K., & Devlin, B. (2001). A Bayesian hierarchical model for allele frequencies. *Genetic Epidemiology*, 20(1), 17-33.
- Lockwood, J. L., Cassey, P., & Blackburn, T. (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in ecology & evolution*, 20(5), 223-8.

- Lombaert, E., Guillemaud, T., Cornuet, J.-M., Malausa, T., Facon, B., & Estoup, A. (2010). Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. *PloS one*, 5(3), e9743
- Lombaert E, Guillemaud T, et al. (2011). Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular Ecology* 20(22): 4654-4670.
- López S, González M, Goldarazena A (2011), *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae): first records in Iberian Peninsula. *EPP0 Bulletin*, 41, 439–441.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & Poorter, M. D. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species IUCN. *SSC Invasive Species Specialist*.
- Lye, G. C., Lepais, O., & Goulson, D. (2011). Reconstructing demographic events from population genetic data: the introduction of bumblebees to New Zealand. *Molecular ecology*, 20(14), 2888-900.
- Mack, R. N. R. N., Simberloff, D., Mark Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M., Bazzaz, F. F. A., & Lonsdale, W. M. M. (2000). Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecological Applications*, 10(3), 689-710.
- Marchetti, M. P., Moyle, P. B., & Levine, R. (2004). Invasive species profiling? Exploring the characteristics of non-native fishes across invasion stages in California. *Freshwater Biology*, 49(5), 646-661.
- Matile-Ferrero, D. (1977). Une cochenille nouvelle nuisible au manioc en Afrique équatoriale *Phenacoccus manihoti* N. SP. (Homoptera, Coccoidea, Pseudococcidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 13(1), 145-152.
- Matsuura, M., & Yamane, S. (1990). *Biology of the vespine wasps*. Springer-Verlag Berlin.
- Matsuura M. (1984). Comparative biology of the five Japanese species of the genus *Vespa* (Hymenoptera, Vespidae). *Bull. Fac. Agric. Mie University* 69: 1-131

- Memmott, J., Craze, P. G., Harman, H. M., Syrett, P., & Fowler, S. V. (2004). The effect of propagule size on the invasion of an alien insect. *Journal of Animal Ecology*, 74(1), 50-62.
- Michener, C. D. (1969). Comparative social behavior of bees. *Annual Review of Entomology*, 14(1), 299-342.
- Mikheyev, A. S. (2008). History, genetics and pathology of a leaf-cutting ant introduction: a case study of the Guadeloupe invasion. *Biological Invasions*, 10(4), 467-473.
- Moilanen, A., Sundstrom, L., & Pedersen, J. S. (2004). Matesoft: a Program for Deducing Parental Genotypes and Estimating Mating System Statistics in Haplodiploid Species. *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 795-797.
- Moller, H. (1996). Lessons for invasion theory from social insects. *Biological Conservation*, 3207(96).
- Morel, L., Vander Meer, R. K., & Lofgren, C. S. (1990). Comparison of nestmate recognition between monogyne and polygyne populations of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 83(3), 642-647.
- Moritz, R.F., Southwick, E.E. and Breh, M. (1985) A metabolic test for the quantitative analysis of alarm behavior of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Experimental Zoology* 235(1): 1-5.
- Muller, F., Rome, Q., Perrard, A., Villemant, C. (2009). Potential influence of habitat type and seasonal variations on prey spectrum of *Vespa velutina*, the Asian Hornet, in Europe. Apimondia, Montpellier, France, 15-20 September.
- Myers, J., Simberloff, D., Kuris, A., & Carey, J. (2000). Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(8), 316-320.
- Nagamitsu, T., & Yamagishi, H. (2009). Nest density, genetic structure, and triploid workers in exotic *Bombus terrestris* populations colonized Japan. *Apidologie*, 40(4), 429-440.

- Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29(1), 1-10
- Nguyen, L. T. P., Saito, F., Kojima, J.-ichi, & Carpenter, J. M. (2006). Vespidae of Viet Nam (Insecta: Hymenoptera) 2. Taxonomic notes on Vespinae. *Zoological Science*, 23(1), 95-104.
- Orivel, J., Grangier, J., Foucaud, J., Le Breton, J., Andrès, F.-X., Jourdan, H., Delabie, J. H. C., et al. (2009). Ecologically heterogeneous populations of the invasive ant *Wasmannia auropunctata* within its native and introduced ranges. *Ecological Entomology*, 34(4), 504-512.
- Page, R. E. (1986). Sperm utilization in social insects. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 297-320.
- Palmer, W. A., Heard, T. A., & Sheppard, A. W. (2010). A review of Australian classical biological control of weeds programs and research activities over the past 12 years. *Biological Control*, 52(3), 271-287.
- Papachristoforou, A., Rortais, A., Zafeiridou, G., Theophilidis, G., Garnery, L., Thrasyvoulou, A., & Arnold, G. (2007). Smothered to death: hornets asphyxiated by honeybees. *Current Biology*, 17(18), R795-R796.
- Papachristoforou, A., Rortais, A., Sueur, J., & Arnold, G. (2011). Attack or retreat: contrasted defensive tactics used by Cyprian honeybee colonies under attack from hornets. *Behavioural processes*, 86(2), 236-41.
- Papachristoforou A, Sueur J, et al. (2008). High frequency sounds produced by Cyprian honeybees *Apis mellifera cypria* when confronting their predator, the Oriental hornet *Vespa orientalis*. *Apidologie* 39(4): 468-474
- Pascual, M., Chapuis, M. P., Mestres, F., Balanyà, J., Huey, R. B., Gilchrist, G. W., Serra, L., et al. (2007). Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology*, 16(15), 3069-3083.

- Passera, L (1994) Characteristics of tramp species. In: Exotic Ants: Biology, Impact, and Control of Introduced Species (ed. Williams DF), pp. 23–43. Westview Press, Boulder.
- Pauchard, I., & Alaback, P. B. (2004). Influence of Elevation, Land Use, and Landscape Context on Patterns of Alien Plant Invasions along Roadsides in Protected Areas of South-Central Chile. *Conservation Biology*, 18(1), 238-248.
- Perrings, C., Williamson, M., Barbier, E. B., Delfino, D., Dalmazzone, S., Simmons, P., & Watkinson, A. (2002). Biological Invasion Risks and the Public Good : an Economic Perspective. *Conservation Ecology*, 6(1), 1.
- Petit, S., & Burel, F. (1998). Effects of landscape dynamics on the metapopulation of a ground beetle (Coleoptera, Carabidae) in a hedgerow network. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 69(3), 243-252.
- Pickett, K.M., Carpenter J.M. (2010) Simultaneous analysis and the origin of eusociality in the Vespidae (Insecta: Hymenoptera). *Arthropod Syst Phylogeny* 68:3–33
- Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, 52(3), 273–288.
- Plunkett, G. M., Moller, H., Hamilton, C., Clapperton, B. K. & Thomas, C. D. (1989). Overwintering colonies of German (*Vespula germanica*) and common wasps (*Vespula vulgaris*) (Hymenoptera: Vespidae) in New Zealand. *N. Z. J. Zool.*, 16: 345-53.
- Porrini *et al.*, (2002). Use of honey bee as bioindicators of environmental pollution in Italy. In Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals (Devillers and Pham-Delègue eds), Taylor and Francis.
- Puillandre, N., Dupas, S., Dangles, O., Zeddami, J.-L., Capdevielle-Dulac, C., Barbin, K., Torres-Leguizamon, M., et al. (2007). Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions*, 10(3), 319-333.
- Rapport Afssa (2008) Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles Document PDF téléchargeable sur le site de la DRAAF Aquitaine.

- Rasner, C. A., Yeh, P., Eggert, L. S., Hunt, K. E., Woodruff, D. S., & Price, T. D. (2004). Genetic and morphological evolution following a founder event in the dark-eyed junco, *Junco hyemalis thurberi*. *Molecular Ecology*, 13(3), 671-681.
- Rasplus, J.-Y., Villemant, C., Rosa Paiva, M., Delvare, G., & Roques, A. (2010). Hymenoptera. Chapter 12. *BIORISK – Biodiversity and Ecosystem Risk Assessment*, 4(2).
- Reznick, D. N., & Ghalambor, C. K. (2001). The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica*, 112-113(1956), 183-198.
- Rome, Q., Muller, F., & Gargominy, O. (2009). Bilan 2008 de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera: Vespidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, 114(3), 297-302.
- Rome, Q., Villemant, C., (2011). Fiche d'aide à l'identification. Les confusions possibles parmi les nids de guêpes. Document PDF téléchargeable sur le site inpn.mnhn.fr.
- Rome, Q., Muller, F., Théry, T., Andrivot, J., Haubois, S., Rosenstiehl, E., Villemant, C. (2011) Impact sur l'entomofaune des pièges à bière ou à jus de cirier utilisés dans la lutte contre le frelon asiatique. In: Barbançon J-M, L'Hostis M (eds), *Proceedings of Journée Scientifique Apicole*, Arles, 11 Feb. 2011. ONIRIS-FNOSAD, Nantes pp. 18-20
- Rome, Q., Muller, F. & Villemant, C. (2012) Expansion 2011 de *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae) en Europe. *Bulletin de la Société Entomologique de France*. Sous presse.
- Rortais, A., Villemant, C., Gargominy, O., Rome, Q., Haxaire, J., Papachristoforou, A., Arnold, G. (2010) A new enemy of honeybees in Europe: The Asian hornet *Vespa velutina*. In: *Atlas of Biodiversity Risks from Europe to the Globe, From Stories to Maps* (eds Settele J), p. 11. Pensoft, Sofia, Moscow.
- Ross, K. G., & Keller, L. (1995). Ecology and evolution of social organization: insights from fire ants and other highly eusocial insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26, 631-656.

- Sakagami and Fukuda (1968) Life tables for worker honeybees. *Res. Popul. Ecol.*, 10: 127-139.
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., Baughman, S., et al. (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), 305-332.
- Savidge, J. A. (1987). Extinction of an Island Forest Avifauna by an Introduced Snake. *Ecology*, 68(3), 660-668.
- Sax, D. F., & Brown, J. H. (2000). The paradox of invasion. *Global Ecology and Biogeography*, 9(5), 363-371.
- Sax, D. F., Stachowicz, J. J., Brown, J. H., Bruno, J. F., Dawson, M. N., Gaines, S. D., Grosberg, R. K., et al. (2007). Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in ecology & evolution*, 22(9), 465-71.
- Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., Brunner, P. C., Seeman, O. D., & Allen, G. R. (2007). Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. *Heredity*, 99(4), 414-22.
- Schneider, S.S., Hoffman, G.D. and Smith, D.R. (2004). The African honey bee: Factors contributing to a successful biological invasion. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 351-376.
- Schofield, P. J., & Chapman, L. J. (1999). Interactions between Nile perch, *Lates niloticus*, and other fishes in Lake Nabugabo, Uganda. *Environmental Biology of Fishes*, 55(4), 343-358.
- Schulmeister, S. (2003). Review of morphological evidence on the phylogeny of basal Hymenoptera (Insecta), with a discussion of the ordering of characters. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(2), 209-243.
- Sharkey, M. J., & Roy, A. (2002). Phylogeny of the Hymenoptera: a reanalysis of the Ronquist *et al.* (1999) reanalysis, emphasizing wing venation and apocritan relationships. *Zoologica Scripta*, 31(February), 57-66.
- Shaw, F., Weidhaas, J. (1956) Distribution and habits of the giant hornet in North America. *Journal of Economic Entomology*, 49, 275

- Shea, K., & Chesson, P. (2002). Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4), 170-176.
- Sherman, P. W., Seeley, T. D., & Reeve, H. K. (1988). Parasites, pathogens, and polyandry in social Hymenoptera. *American Naturalist*, 131(4), 602-610
- Short, J. (2002). Surplus killing by introduced predators in Australia—evidence for ineffective anti-predator adaptations in native prey species? *Biological Conservation*, 103(3), 283-301.
- Simberloff, D., & Stiling, P. (1996). Risks of species introduced for biological control. (D. F. Williams, Ed.) *Biological Conservation*, 78(1-2), 185-192.
- Simberloff, D. (2003). How Much Information on Population Biology Is Needed to Manage Introduced Species? *Conservation Biology*, 17(1), 83-92.
- Starr, C. K. (1984). Sperm competition, kinship, and sociality in the aculeate Hymenoptera. (R. L. Smith, Ed.) *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*, 427-464.
- Strayer, D. L., Eviner, V. T., Jeschke, J. M., & Pace, M. L. (2006). Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(11), 645-651.
- Suarez, A., Tsutsui, N., & Holway, D. (1999). Behavioral and genetic differentiation between native and introduced populations of the Argentine ant. *Biological Invasions*, 43-53.
- Suarez, A. V., & Tsutsui, N. D. (2008). The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular ecology*, 17(1), 351-60.
- Suehs, C.M., Affre, L. & Medail, F., (2004). Invasion dynamics of two alien *Carpobrotus* (Aizoaceae) taxa on a Mediterranean island. 1. Genetic diversity and introgression. *Heredity*, 92(6), 550-556.
- Sumner, S., Lucas, E., Barker, J., & Isaac, N. (2007). Radio-tagging technology reveals extreme nest-drifting behavior in a eusocial insect. *Current biology : CB*, 17(2), 140-5.

- Takahashi, J., Nakamura, J., & Akimoto, S. (2004). Kin structure and colony male reproduction in the hornet *Vespa crabro* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of ethology*, 43-47.
- Tan, K., Li, H., Yang, M. X., Hepburn, H. R., & Radloff, S. E. (2010). Wasp hawking induces endothermic heat production in guard. *Journal of Insect Science*, 10(142), 1-6.
- Tan, K., Radloff, S. E., Li, J. J., Hepburn, H. R., Yang, M. X., Zhang, L. J., & Neumann, P. (2007). Bee-hawking by the wasp, *Vespa velutina*, on the honeybees *Apis cerana* and *A. mellifera*. *Die Naturwissenschaften*, 94(6), 469-72.
- Tarpy, D. R., & Jr., R. E. P. (2001). The curious promiscuity of queen honey bees (*Apis mellifera*): evolutionary and behavioral mechanisms. *Ann Zool Fennici*, 38(September), 255-265.
- Thomas C. R. (1960)- The European wasp (*Vespula germanica* Fab.) in New Zealand.- New Zealand Department of Scientific and Industrial Research Information series, 27: 1-74.
- Thomas, M.L., Becker, K., Abbott, K. and Feldhaar, H. (2010). Supercolony mosaics: two different invasions by the yellow crazy ant, *Anoplolepis gracilipes*, on Christmas Island, Indian Ocean. *Biological Invasions* 12: 677-687.
- Tiébré, M.-S., Bizoux, J.-P., Hardy, O. J., Bailey, J. P., & Mahy, G. (2007). Hybridization and morphogenetic variation in the invasive alien *Fallopia* (Polygonaceae) complex in Belgium. *American Journal of Botany*, 94(11), 1900-1910.
- Tourchin, M. E., Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (2002). Parasites and marine invasions. *Parasitology*, 124 Suppl(2), S137-51.
- Tsutsui, N. D., Suarez, a V., Holway, D. a, & Case, T. J. (2000). Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5948-53.
- Tsutsui, N. D., & Suarez, A. V. (2003). The Colony Structure and Population Biology of Invasive Ants. *Conservation Biology*, 17(1), 48-58.

- Vargo, E. L., & Fletcher, D. J. C. (1989). On the relationship between queen number and fecundity in polygyne colonies of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Physiological Entomology*, 14, 223-232.
- Vellend, M., Harmon, L. J., Lockwood, J. L., Mayfield, M. M., Hughes, A. R., Wares, J. P., & Sax, D. F. (2007). Effects of exotic species on evolutionary diversification. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(9), 481-488.
- Verdu, P., Austerlitz, F., Estoup, A., Vitalis, R., Georges, M., Théry, S., Froment, A., et al. (2009). Origins and genetic diversity of pygmy hunter-gatherers from Western Central Africa. *Current biology : CB*, 19(4), 312-8.
- Vilhelmsen, L. (2001). Phylogeny and classification of the extant basal lineages of the Hymenoptera (Insecta). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 131(4), 393-442.
- Villemant, C., Haxaire, J., & Streito, J. C. (2006). Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en. *Bulletin de la Société entomologique de France*, 111(4), 535-538. Société entomologique de France.
- Villemant C (2008) *Apis cerana* se défend contre *Vespa velutina* : observations dans le massif forestier du Bi Doup, Vietnam (Hym.). *Bulletin de la Société entomologique de France* 113(3) : 312-312.
- Villemant, C., Rome, Q., Muller, F., Arca, M. & Maher, N. (2008). Etude de la biologie, du comportement et de l'impact de *Vespa velutina* sur les abeilles en vue d'un contrôle spécifique. Programme Communautaire pour l'Apiculture, CE n°797/2007-2010, rapport final 2007-2008, 46 p.
- Villemant C., Rome Q., Muller F., Arca M., Darrouzet E. & Maher N. (2009). Etude de la biologie, du comportement et de l'impact de *Vespa velutina* sur les abeilles en vue d'un contrôle spécifique. *Programme Communautaire pour l'Apiculture, CE n°797/2007-2010*, rapport final 2008-2009, 62 p.
- Villemant, C., Rome, Q., Muller, F., Arca, M., Arnold, G., Mougel, F., Silvain, J.-F., et al. (2010) Etude de la biologie, du comportement et de l'impact de *Vespa velutina* sur les abeilles en vue d'un contrôle spécifique. *Programme Communautaire pour l'Apiculture, CE n°797/2007-2010*, rapport final 2009-2010, 66 p.

- Villemant, C., Barbet-Massin, M., Perrard, A., Muller, F., Gargominy, O., Jiguet, F., & Rome, Q. (2011). Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. *Biological Conservation*, (2010).
- Villemant, C., Muller, F., Haubois, S., Perrard, A., Darrouzet, E., Rome, Q. (2011b) Bilan des travaux (MNHN et IRBI) sur l'invasion en France de *Vespa velutina*, le frelon asiatique prédateur d'abeilles. In: Barbançon J-M, L'Hostis M (eds), *Proceedings of Journée Scientifique Apicole*, Arles, 11 Feb. 2011. ONIRIS-FNOSAD, Nantes pp. 3-12
- Villemant, C., Rome, Q., Muller, F., Arca, M., Arnold, G., Mougel, F., Silvain, J.-F., et al. (2011c). Etude de la biologie, du comportement et de l'impact de *Vespa velutina* sur les abeilles en vue d'un contrôle spécifique. *Programme Communautaire pour l'Apiculture, CE n°797/2007-2010*, rapport final 2008-2011, 51 p.
- Walker, B., & Steffen, W. (1997). An overview of the implications of global change for natural and managed terrestrial ecosystems. *Conservation Ecology*, 1(2), 2.
- Wan, F., Zhang, G., Liu, S., Luo, C., Chu, D., Zhang, Y., Zang, L., et al. (2009). Invasive mechanism and management strategy of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotype B: progress report of 973 Program on invasive alien species in China. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences*, 52(1), 88-95.
- West-Eberhard, M. J. (1989). Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20(1), 249-278.
- Whitfield, J. B. (1998). Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 43, 129-151.
- Wiles, G. J., Bart, J., Beck, R. E., & Aguon, C. F. (2003). Impacts of the Brown Tree Snake: Patterns of Decline and Species Persistence in Guam's Avifauna. *Conservation Biology*, 17(5), 1350-1360.
- Williamson, H., & Fitter, A. (1996). The characters of successful invaders. *Biological Conservation*, 78(1-2), 163-170.
- Williamson, M.H. (1999) Invasions. *Ecography* 22: 5-12.

- Williamson, M. (2006). Explaining and predicting the success of invading species at different stages of invasion. *Biological Invasions*, 8(7), 1561-1568.
- Wilson, E. O. (1971). *The Insect Societies*. (C. Murchison, Ed.) Cambridge Belknap Press of Cambridge University Press (Vol. 21, p. 548).
- Zayed, A., & Packer, L. (2005). Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10742-10746.
- Zeisset, I., & Beebee, T. J. C. (2003). Population genetics of a successful invader: the marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. *Molecular Ecology*, 12(3), 639-646.