UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

UMR 7261, Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte

THÈSE présentée par :

Mélissa HAOUZI

Soutenue le : **23 Novembre 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteure de l'Université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

La communication chimique chez le frelon invasif *Vespa velutina nigrithorax*

THÈSE dirigée par :
M. DARROUZET Éric — Maître de conférences, HDR, Université de Tours

RAPPORTEURS :
Mme. D'ETTORRE Patrizia — Professeure, Université Sorbonne Paris Nord
M. SANDOZ Jean-Christophe — Directeur de recherche CNRS, Université Paris Saclay

---

JURY :
Mme. BANKHEAD Stéphanie — Maîtresse de conférences, HDR, Université d'Orléans
M. DARROUZET Éric — Maître de conférences, HDR, Université de Tours
Mme. D'ETTORRE Patrizia — Professeure, Université Sorbonne Paris Nord
M. SANDOZ Jean-Christophe — Directeur de recherche CNRS, Université Paris Saclay
Mme. LORENZI Maria-Cristina — Professeure, Université Sorbonne Paris Nord (Présidente du jury)

Remerciements

Tout d'abord, je tenais à remercier **Éric**, mon directeur de thèse. Je vous remercie pour ces trois années qui m'ont permis de grandir scientifiquement. Merci pour toutes nos discussions et échanges, mais surtout, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de cette thèse. Merci également de m'avoir encouragé à créer des collaborations que ce soit lors des congrès scientifiques auxquels j'ai pu participer ou lors de différents projets.

Je souhaite remercier **l'école doctorale SSBCV** de m'avoir accordé mon financement doctoral, mais également la **section française de l'Union Internationale pour l'Étude des Insectes Sociaux** (IUSSI) pour la bourse qui m'a été accordée en 2022 afin de présenter mes travaux de thèse devant un public scientifique international à San Diego.

Je tiens également à remercier la **Direction de l'IRBI** : David, Christelle et Simon. Je remercie plus particulièrement **Christelle** pour son soutien quand ce fût compliqué pour moi. Merci de m'avoir écouté et de m'avoir permis de garder ma motivation. Je garde en mémoire ta gentillesse, ta bienveillance, mais également tes super goûts vestimentaires ! Merci également au secrétariat, et plus particulièrement, merci à **Aurélie**, **Aïcha** et **Marjorie** pour leur aide quand je faisais face à de l'administratif, ainsi que pour leur gentillesse.

Je tenais à remercier mon jury de thèse, **Maria Cristina Lorenzi**, **Patrizia d'Ettorre**, **Stéphanie Bankhead** et **Jean-Christophe Sandoz**. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de participer à ma soutenance de thèse. Je remercie plus particulièrement Patrizia et Jean-Christophe d'avoir accepté d'être respectivement ma rapporteuse et mon rapporteur.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse : **Anne-Marie Cortesero**, **Cédric Alaux**, **Christophe Lucas** et **Claudio Lazzari** pour tous les conseils qu'ils m'ont apportés à mi-chemin pendant ma thèse, et qui ont été bénéfiques pour la poursuite de mon projet.

Je remercie l'équipe frelon : Annie V., Eva, Florian et Pierre-Alban. Une mention spéciale à **Florian**, plus communément appelé **Flouz la loose**. J'ai passé de super moments en ta compagnie. Tu as été le meilleur binôme que je pouvais imaginer malgré la loose qu'on avait. Merci pour ton sourire et ta gentillesse incroyable. Je n'oublierais pas tous ces moments passés, que ce soit sur le terrain, dans La Manche, au laboratoire ou lors de nos soirées trop arrosées. Comment oublier ces trajets sur le terrain dans ta « superbe » voiture où on n'était jamais sûr d'arriver à destination. Mais aussi, comment oublier tes goûts musicaux qui laissent à désirer et que j'ai dû subir pendant nos longs trajets sur le terrain. Tu as été d'un énorme soutien pendant cette thèse, à la fois humainement et scientifiquement ; et je t'en serais éternellement reconnaissante. Merci à **Annie V.**, pour ta gentillesse et toute l'aide que tu as pu me donner au cours de cette thèse. Sans toi, les frelons n'auraient jamais été si bien nourris, et ils n'auraient pas aussi bien survécu. Merci à **Eva** d'avoir été présente quand j'en avais besoin, ainsi que pour nos discussions scientifiques ou non. Enfin, merci à **Pam** pour ta gentillesse et ta décontraction légendaire.

Je remercie également l'équipe frelon « made in Portugal » : **Paula** et **Artur**. Merci pour votre bonne humeur et tous les moments qu'on a pu partager pendant ces quelques mois. Les « amazing » m'ont beaucoup manqué après votre départ !

Un grand merci à **Elfie**. Les glandes nous auront donné du fil à retordre, mais on y est arrivé ! Merci d'avoir pris le temps de m'aider quand j'en avais besoin. Je garderais en souvenir ta gentillesse et ta « folie », que ce soit à Center Parc où tu étais la première à l'eau, où en Corse quand il s'agissait de boire un coup accompagné de saucisson !

Je tiens à remercier grandement **Christophe L.** Merci pour ton soutien scientifique, ton aide et nos nombreuses discussions. Merci pour ta gentillesse et de m'avoir pris sous ton aile pendant les différents congrès que nous avons partagés. Tu as toujours su te rendre disponible pour moi et je t'en suis très reconnaissante.

Je tiens également à remercier **Laureen**. Merci pour ton aide dans les nombreuses dissections et pour ta gentillesse. Te croiser dans les couloirs et ton sourire quotidien va me manquer.

Un grand merci à **Irène**. Tu m'as beaucoup aidé quand j'avais des questions et besoin de conseils. Merci également pour ta gentillesse et ta relecture.

Merci à **Simon**. Tu as toujours été présent pour m'aider dans les petits tracas du laboratoire. J'ai également eu grâce à toi, une toute nouvelle peinture dans mon bureau (mieux vaut tard que jamais !).

Merci à **Charlotte**. Merci pour le soutien que tu as eu envers moi et pour ta bienveillance.

Je remercie également tous les membres de **l'équipe ESORE**, pour toutes les discussions que nous avons pu avoir lors des réunions, repas partagés où autres.

Je tiens également à remercier **Sylvain**, mon parrain, pendant ces trois dernières années. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ton soutien. Tu as su être présent quand j'en avais besoin, et c'était très important pour moi.

Je remercie également les membres du **département de Biologie Animale et Génétique**. Mais je remercie plus particulièrement **Marlène**, **Fernando**, **Marie**, **Sébastien** et **Stéphane** qui ont su me faire confiance pour leurs enseignements.

Je remercie le club des « vieux » du midi, d'après **Christophe B**. Merci à toi, **Carole** et **Karine** d'avoir partagé des moments de convivialité autour de nos repas. Je sais que le canapé vous fait peur, mais vous êtes et resterez jeunes, donc foncez-vous y installer ! Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai pu discuter pendant les pauses du midi ou les pauses-café, que ce soit **Jean-Michel**, **Elisabeth H**, **Vincent F**, **Lorène**, **Matthieu L** et tous les autres.

Ces trois années de thèse m'ont également permis de rencontrer « les copains », et qui sont aujourd'hui devenus des amis. Parmi eux, je citerais **Lucas**, le bébé, qui a d'abord été mon parrain. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Merci pour toutes ces soirées et ces moments partagés qui font du bien. Et qui sait, peut-être qu'un jour, ils trouveront l'amour dans le pré !

Un grand merci à **Louis,** ou plutôt Greuh. Écrire tout ce qu'on a partagé serait trop long, car on a traversé pas mal de pays (et de continents) ensemble. Tu as su être présent malgré la distance, et d'un grand soutien pour ma fin de thèse, et je t'en suis reconnaissante.

Un immense merci à **Marie-Charlotte**. J'ai été très heureuse de partager avec toi le même bureau. Je n'oublierais pas notre hymne national « Une petite pointe de sel », mais aussi « La policière ». Merci pour ton immense soutien, que ce soit au niveau scientifique, mais aussi humain. Grâce à toi, R commence à ne plus avoir de secrets. Je n'oublierais pas les soirées à base de sangria ou de punch (plus jamais !), ainsi que la cérémonie que tu as organisée pour la perte de mon poisson de bureau Erophe (RIP) !

Un énorme merci à **Romain**, le Bro, pour sa bonne humeur permanente et son humour. Merci encore pour ta relecture, qui fût bien précieuse ! Paris a beaucoup de chance de t'avoir dans leur équipe ; tu nous as grandement manqué ces derniers mois !

Un grand merci à mon petit Paulo**, Paul**. Merci d'avoir été si bienveillant envers moi et pour toute l'aide que tu as pu m'apporter pendant cette thèse ainsi que dans la rédaction de mon manuscrit. Ton frelon est juste superbe et embellit mes travaux de thèse ! Merci à ma Nach nach, **Nachida**, pour nos discussions girly. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ton son sourire. Goûter tes recettes va me manquer ! Je remercie également **Camille**. Merci pour ta gentillesse, ta générosité et tes blagues carambar ou Pom'potes. Même si ce n'était pas bon pour mon régime, je n'oublierais pas comment tu as su me redonner le sourire avec tes chocolats quand la situation était compliquée pour moi. Tu vas beaucoup me manquer. Merci également à **Gwenaëlle** pour toutes nos discussions et moments partagés, notamment à Florence. Enfin merci à tous les doctorants ou non-doctorants qui ont toujours su faire preuve de bienveillance et de positivité quand j'en manquais. Merci à **Martin D**, **Corentin**, **Solène et tous les autres**…

Je remercie également mes stagiaires **Sarah**, **Thomas**, **Coralie**, **Chloé** et **Bastien** qui m'ont aidé lors de différents projets.

Merci à tous les **membres de l'IRBI** que j'ai pu croiser de près ou de loin. L'IRBI va clairement me manquer.

Merci aux **riveraines,** aux **riverains** et aux **mairies** qui m'ont permis de récolter des nids grâce à de nombreux signalements et une belle coopération. Merci à **Antoine Metayer**, d'avoir organisé mon terrain dans La Manche, ce qui m'a permis d'agrandir mon échantillonnage. Bien évidemment, merci à tous les frelons qui ont été sacrifiés au cours de ma thèse.

Passons maintenant aux personnes qui font partie de mon entourage depuis bien longtemps…

Parfois, dans la vie, il suffit de chuter de poney, ou d'être mordu de cheval pour faire des rencontres extraordinaires. Je remercie de tout mon cœur, **Maeva**, mon amoureuse, d'avoir été présente toutes ces années, et de m'avoir soutenu « pour le meilleur et pour le pire ». Je ne saurais pas décrire à quel point tu as été un point essentiel dans ma vie. Toujours prête à m'écouter, me soutenir, et même relire ma thèse, merci pour tout ! Un énorme merci également à **Aude**. Tu as toujours été là pour moi, et je t'en suis énormément reconnaissante. Merci pour ta présence et ta folie. Grâce à toi, j'ai pu réaliser un rêve d'enfant pendant cette dernière année de thèse, et ça restera l'un de mes plus beaux souvenirs.

Mais aussi, je remercie mes amis de licence : ma petite **Angèle**, **Uranie** (Uranaye) et **Madeleine** (Madou). Ma petite Angèle, tu es d'une gentillesse incroyable et d'une générosité sans nom. Merci pour tout le soutien que tu as pu m'apporter avant et pendant ma thèse. Tout le monde rêverait d'avoir une amie comme toi ! Uranaye, Madou, vous êtes toutes les deux extraordinaires, tant par votre joie de vivre que par votre non-objectivité à mon égard. Ne changez pas, et restez comme vous êtes. Girls power !

Merci à mes amis de master qui m'ont toujours soutenu : **Arthur**, **Julie**, **Jérémy**, **Stéphane**, **Honorine**, et **Galice**. Une pensée à mon amie **Clara**, qui sera éternellement dans mon cœur. Sans toi et ton soutien en deuxième année de master, je n'aurais jamais été là aujourd'hui, et je t'en remercie. Je souhaite également transmettre une pensée chaleureuse à sa famille.

Mais également, merci à celles qui partagent la même passion que moi, et qui sont toujours prêtes pour aller boire un verre, aller à un festival écouter « gros gâteaux », se balader à cheval ou juste marcher dans la carrière pour discuter de tout et de rien. Merci à **Marine**, **Manon**, **Claire**, **Bérénice** et **Jade**.

Merci à toutes les personnes qui ont été présentes depuis que je suis arrivée à Tours. Merci à ces personnes qui ont toujours souhaité que je réussisse professionnellement. Merci à ma petite **Sonia**, **Delph,** ma grande **Sonia**, **Nico**, **Elo** et le **Chef**. Merci à toute l'équipe de l'Orangerie.

Merci à **ma famille** présente depuis toujours, que ce soient mes cousins/cousines, tatas et tontons.

Un immense merci à **Xavier** et ma **maman** d'avoir été là pour moi. Merci de m'avoir soutenu, comme vous le faite chaque jour, avec tant d'amour. Je vous aime de tout mon cœur et je ne pourrais jamais vous remercier suffisamment. Une mention spéciale à toi, maman. Les épreuves de la vie ne nous ont pas gâtées, mais quand je vois où j'en suis aujourd'hui, c'est grâce à ton immense courage. Un simple merci ne suffirait pas pour t'exprimer ma reconnaissance et ma gratitude dans l'accomplissement de cette thèse, mais également dans ma vie.

Enfin, je terminerais par ma plus belle rencontre au cours de cette thèse, mais aussi la plus importante à mes yeux, **Mathieu**. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi, que ce soit pour ton soutien infaillible et ta présence inconditionnelle. Merci de m'avoir redonné le sourire quand ça n'allait pas. Merci d'avoir partagé tant de beaux moments avec moi, mais également d'avoir partagé les plus compliqués. Je te dédierais tout simplement mon plus grand merci dans l'accomplissement de cette thèse. Sans toi, cela n'aurait pas été possible. Enfin, je te remercie de croire en moi et de me porter vers le haut. J'ai énormément de chance de t'avoir auprès de moi.

Je dédie cette thèse à mon papa.

Résumé

Le terme de socialité chez les insectes est employé lorsque des membres d'une même espèce vivent en groupes et coopèrent pour leur développement. L'organisation sociale des insectes sociaux nécessite un système de communication intra-colonial performant, afin de permettre aux membres de la colonie de percevoir et d'interagir collectivement avec leur environnement. Pour cela, ils utilisent la communication chimique impliquant l'utilisation de divers composés sémiochimiques. Parmi eux, les Hydrocarbures Cuticulaires (CHCs) peuvent être employés dans des phénomènes de reconnaissance interindividuels et participer à l'organisation sociale des colonies. Ils forment la signature chimique des individus. La phéromone d'alarme, pour sa part, est essentielle à la survie de la colonie en permettant le recrutement de congénères et la mise en place de mécanismes de défense lorsqu'un danger la menace. Au cours de cette thèse, j'ai donc exploré différents paramètres concernant l'acquisition et la dynamique de ces deux composés sémiochimiques, afin de mieux comprendre le système de communication chimique chez un insecte à la fois social et invasif, le frelon à pattes jaunes *Vespa velutina nigrithorax*. En effet, ces substances sémiochimiques, qui sont des composantes majeures à l'établissement et au maintien de la vie coloniale, pourraient être au cœur de leur succès invasif.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont démontré une hétérogénéité chimique de la phéromone d'alarme chez les frelons à deux niveaux : selon la caste des individus, mais aussi selon les colonies. Ces résultats ont souligné la dynamique du signal d'alarme chez les femelles fertiles et chez les ouvrières qui exercent différentes activités coloniales. Ce signal pourrait donc être perçu comme un signal de reconnaissance et transmettre différents types d'information au sein de la colonie afin d'obtenir des réponses variables. Par la suite, l'importance des signaux de reconnaissance a été vérifiée grâce à une acquisition rapide des profils cuticulaires en moins de 48 heures. Une hétérogénéité chimique des ouvrières en fonction de leur activité a également été mise en évidence, suggérant ainsi une spécialisation des tâches chez le frelon à pattes jaunes. Enfin, l'impact d'un apport d'acides gras insaturés sur la signature chimique des adultes a été analysé, et leur implication comme précurseurs dans la voie de biosynthèse des alcènes chez les ouvrières adultes a été mis en évidence.

Dans son ensemble, cette thèse a permis de souligner une organisation sociale très élaborée chez le frelon à pattes jaunes, avec un système de communication chimique complexe, hétérogène et dynamique. Cette thèse ouvre ainsi de nouvelles perspectives d'études concernant l'impact de facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant modifier les systèmes de communication et par conséquent l'organisation sociale de cet insecte. Également, des perspectives comportementales concernant la présence d'un potentiel polyéthisme d'âge et du modèle Gestalt chez les Vespidés ont été évoquées.

Mots clés : Phéromone d'alarme, Hydrocarbures cuticulaires, socialité, Vespidae

Abstract

In insects, the term of sociality is used when members of the same species live in groups and cooperate for their development. The social organisation of social insects requires an efficient intra-colony communication system to enable colony members to perceive and interact collectively with their environment. This can be achieved through chemical communication, which involves the use of various semiochemical compounds. Among them, Cuticular Hydrocarbon Compounds (CHCs) can be employed in inter-individual recognition phenomena and play an important action in the social organisation of colonies. They formed the chemical signature of individuals. The alarm pheromone, for its part, is essential to colonial survival by enabling the recruitment of conspecifics and the implementation of defence mechanisms when a danger is present. During this thesis, I explored various parameters concerning the acquisition and the dynamics of both semiochemical compounds, in order to understand the chemical communication system in a social and invasive insect, the Yellow-legged Hornet *Vespa velutina nigrithorax*. In fact, these semiochemical substances, which are major components in the establishment and maintenance of colonial life, could be at the heart of their invasive success.

The work carried out during this thesis demonstrated a chemical heterogeneity of the alarm pheromone in females as well as at the colonial level. These results highlighted the dynamics of the alarm signal in fertile females and also in workers carrying out different colonial activities. This signal could therefore be perceived as a recognition signal and transmit different types of information within the colony in order to obtain variable responses. Subsequently, the importance of recognition signals was revealed by a rapid acquisition of cuticular profiles in less than 48 hours. A chemical heterogeneity of workers according to their activity was also demonstrated, suggesting a task specialisation in the Yellow-legged hornet. Finally, the impact of an intake of unsaturated fatty acids on the chemical signature of adults was revealed, and their involvement as precursors in the alkene biosynthesis pathway in adults was discussed.

Overall, this thesis has highlighted the highly elaborate social organisation of the Yellow-legged hornet, with a complex, heterogeneous and dynamic chemical communication system. This thesis opens up new researches about the impact of intrinsic and extrinsic factors that can modify the communication systems and consequently the social organisation of this insect. In addition, behavioural perspectives about the presence of a potential age polyethism and the Gestalt model in the Vespidae were discussed.

Key words: Alarm pheromone, Cuticular Hydrocarbon Compounds, sociality, Vespidae

Indexe

%	Pourcentage
Amu	Unité de masse atomique
°C	Degré Celsius
CHCs	Hydrocarbures cuticulaires
CO2	Dioxyde de carbone
DOL	Division du travail
ECL	Longueur de chaîne équivalente
e.g.	« *exempli gratia* », à titre d'exemple
ev	Électron volt
Fig.	Figure
FM	Fourrageuse dite de "matériaux"
g, mg	Grammes, milligrammes
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse
GC-FID	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
h	Heures
HS-SPME	Microextraction sur phase solide dans l'espace de tête (headspace)
ID	Identification
i.e.	« *id est* », ce qui signifie
INPN	Inventaire National du Patrimoine Naturel
IUSSI	Union Internationale pour l'Étude des Insectes Sociaux
KRI	Indice de rétention de Kovats
OBPs	Protéines de liaison odorante
ORNs	Neurones sensoriels olfactifs
SPME	Microextraction sur phase solide
vs	« *versus* », par opposition
JH	Hormone juvénile
min	Minutes
ml, µl	Millilitres, microlitres
mm	Millimètres
mol	Mole
n, N	Nombre
p	P-valeurs
PDMS	Polydimethylsiloxane
rpm	Tours par minutes
RT	Temps de rétention
s	Secondes
SE	Erreur standard
VIP	Importance des variables dans la projection

Table des figures (hors articles)

Tableau 1 : Hiérarchisation des différents degrés de socialité 4

Figure 1. Facteurs internes et externes pouvant moduler l'attribution d'une tâche à réaliser par les ouvriers 9

Figure 2. Modèle d'invasion théorique « Minimum Viable Beachhead Population » 11

Figure 3. Représentation des différentes catégories de médiateurs chimiques 15

Figure 4. Représentation des différentes étapes de l'évolution de la communication chimique 15

Figure 5. Localisation des glandes exocrines chez la fourmi 17

Figure 6. Schéma simplifié du système olfactif 19

Figure 7. Biosynthèse simplifiée des hydrocarbures cuticulaires 27

Figure 8. Cycle de vie de *Vespa velutina nigrithorax* 40

Figure 9. Distribution européenne de *Vespa velutina nigrithorax* en 2023 42

Figure 10. Schéma représentant les différents objectifs de la thèse 49

Figure 11. Schéma récapitulatif concernant le système de communication chimique du frelon à pattes jaune 199

SOMMAIRE

Introduction Générale---------- 1
I. La socialité chez les insectes---------- 2
A. Principes de la socialité---------- 2
a. Les formes de vie sociale---------- 2
b. Les bénéfices de la vie sociale---------- 4
c. Les coûts de la vie sociale---------- 5
B. La division du travail chez les insectes sociaux---------- 7
C. Le potentiel invasif des insectes sociaux---------- 9
II. La communication chez les insectes----------11
A. Quelques généralités ----------11
a. Les modalités de la communication ----------11
b. Les fonctions de la communication----------12
B. La communication chimique----------14
a. Généralités----------14
b. Production, dissémination et détection des composés sémiochimiques ----------16
c. Evolution sociale et communication chimique----------19
d. La communication intra-coloniale chez les insectes eusociaux----------20
e. Médiateurs chimiques chez les insectes eusociaux ----------21
III. Les Hydrocarbures Cuticulaires (CHCs) chez les insectes eusociaux ----------22
A. Médiateurs----------22
B. Les voies de biosynthèse ----------26
C. La signature coloniale----------27
D. Les facteurs qui modulent la signature chimique ----------29
a. Les facteurs intrinsèques ----------29
b. Les facteurs extrinsèques----------30
IV. La phéromone d'alarme chez les insectes eusociaux----------32
A. Médiateurs----------32
B. La voie de biosynthèse----------34
C. Les facteurs qui modulent la phéromone d'alarme ----------35
a. Les facteurs intrinsèques ----------35
b. Les facteurs extrinsèques----------35
Problématique de thèse ---------- 37
I. Le modèle biologique----------38
A. Biologie du frelon ----------38
a. Morphologie des castes----------38
b. Cycle de vie ----------39
c. Comportement des ouvrières ----------40
B. Une invasion fulgurante ----------41
a. Aire de répartition naturelle----------41
b. Histoire de son invasion ----------41
c. Les impacts de l'invasion ----------43
C. Un système de communication chimique hétérogène----------44
II. Le sujet de thèse ----------47
Chapitre 1 : La communication chimique chez les différentes castes------- 51
Résumé du chapitre----------52
Abstract ----------54
Introduction----------55
Materials and methods ----------58

Results---63
Discussion ---69
Chapitre 2 : Acquisition de la communication chimique en fonction de l'âge et de l'environnement social---75
Résumé du chapitre---76
Partie 1 : La signature chimique---78
Abstract ---79
Introduction---79
Materials and Methods---81
Results---86
Discussion ---90
Supplementary materials ---93
Partie 2 : La phéromone d'alarme---100
Abstract ---101
Introduction---101
Materials and Methods---104
Results---107
Discussion ---109
Chapitre 3 : Spécialisation chimique des ouvrières et odeur coloniale ---113
Résumé du chapitre---114
Partie 1 : La signature chimique---117
Abstract ---118
Introduction---119
Materials and Methods---121
Results---126
Discussion ---131
Supplementary materials ---136
Partie 2 : La phéromone d'alarme---142
Abstract ---143
Introduction---143
Materials and Methods---146
Results---150
Discussion ---152
Conclusion---155
Supplementary materials ---156
Chapitre 4 : Effet des acides gras insaturés sur la signature chimique---157
Résumé du chapitre---158
Abstract ---160
Introduction---160
Materials and Methods---163
Results---166
Discussion ---170
Supplementary materials ---173
Discussion Générale---181
III. Un système de communication chimique dynamique---184
A. Un signal d'alarme hétérogène ---184
a. En fonction de la caste---184
b. En fonction de l'âge---185
B. L'importance des signaux de reconnaissance ---187

a. Une acquisition rapide de la signature chimique---------- 187
b. La spécialisation chimique coloniale ---------- 188
IV. La spécialisation chimique des ouvrières ---------- 191
A. Une organisation sociale élaborée---------- 191
B. Un potentiel polyéthisme d'âge ---------- 194
V. L'impact du régime alimentaire sur la communication chimique ---------- 195
Conclusion ---------- 197
Références Bibliographiques---------- 201
Annexe---------- 225

Introduction Générale

“Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.”

Marie Curie

I. La socialité chez les insectes

A. Principes de la socialité

Dans de nombreuses niches écologiques, les organismes vivants ont tendance à se regrouper. Ce phénomène appelé socialité, est commun chez de nombreuses espèces du règne animal. La notion de socialité est alors employée lorsque des membres d'une même espèce vivent en groupes et coopèrent au cours de leur vie pour leur développement. La socialité peut cependant varier d'une espèce à l'autre. Il y a un degré de socialité allant de la forme la plus simple pour les organismes ayant un mode de vie solitaire, à la forme la plus complexe pour ceux vivant au sein de groupes sociaux complexes (Szathmary and Smith 1995).

a. *Les formes de vie sociale*

Certaines sociétés d'insectes sont souvent considérées comme le sommet de l'évolution sociale, et le degré de socialité peut être hiérarchisé *(Tableau 1)* (Wilson 1971; Aron and Passera 2009; Costa 2018). Pour les espèces dites « **solitaires** », les interactions entre les individus se réduisent à des accouplements, comme c'est classiquement reconnu chez les drosophiles[1] (Bontonou and Wicker-Thomas 2014). Par la suite, nous retrouvons les espèces « **grégaires »,** qui peuvent former la plupart du temps, des groupes temporaires entre les membres d'une même génération, comme c'est le cas chez les criquets (Boake 1984). Ensuite, il y a les espèces « **subsociales** », qui forment des groupes familiaux avec la présence de comportements parentaux chez les reproducteurs. Cette forme de socialité peut se retrouver par exemple chez les coléoptères *Nicrophorus vespilloides* (Cunningham et al. 2014). Les espèces « **coloniales** » forment également des groupes familiaux et partagent cette fois-ci un site de

[1]Toutefois, les drosophiles pourraient présenter une forme de socialité plus complexe, d'après Christophe BILLETIER, lors de sa présentation intitulée « The social life of *Drosophila* », lors de la IUSSI section Française en 2023.

nidification commun. Viennent ensuite, les espèces « **communales** » lorsque les individus d'une même génération partagent un site de nidification commun, avec en l'occurrence, des individus qui coopèrent dans les soins aux jeunes, mais pas dans les soins aux couvains. Ce type de socialité peut être présent chez différentes espèces d'abeilles, telles que les andrènes *Perdita Texana* (Danforth et al. 1996). Les membres d'une même génération qui se retrouvent en colonie, et qui cette fois-ci coopèrent à la fois pour les soins aux jeunes et aux couvains sont considérés comme des insectes « **quasi sociaux** ». C'est le cas par exemple des coléoptères du genre *Nicrophorus* (Trumbo and Wilson 1992). Les espèces « **semi sociales** » correspondent aux insectes quasi sociaux, mais présentent une division du travail reproducteur, avec la spécialisation d'individus assignés à la reproduction, comme chez certaines abeilles Halictidés, telles que *Augochloropsis sparsilis* et trois espèces de *Pseudaugochlorops* (Michener 1969). Enfin, le degré de socialité le plus élevé correspond aux insectes dits « **eusociaux** ». Ces derniers vivent en colonie et doivent répondre à 3 critères : les générations se chevauchent, des soins coopératifs du couvain sont mis en place et il y a une division du travail avec parfois la mise en place de castes spécialisées dans la reproduction. Ce dernier groupe rassemble des Hyménoptères incluant les fourmis, certaines abeilles et guêpes, ainsi que des Isoptères tels que les termites. La colonie présente alors un niveau d'organisation supérieur à l'organisme individuel ; on peut parler de **super-organismes**. Cette notion apparaît lorsque les individus d'une colonie se comportent et coopèrent comme une entité à part entière, où le phénotype de la colonie est analogue au phénotype individuel (Detrain and Deneubourg 2006; Wilson and Hölldobler 2009; Johnson and Linksvayer 2010).

Tableau 1 : Hiérarchisation des différents degrés de socialité présents chez les insectes suivant des caractères de plus en plus complexes. Tableau adapté de Wilson 1971; Aron and Passera 2009; Costa 2018. Le « + » désigne la présence d'un caractère pour les différentes formes de vie sociale. Cette classification ne tient pas compte de tous les degrés de socialité existants.

Degré de socialité	*Interaction entre les individus*	*Comportements parentaux*	*Site d' élevage commun*	*Coopération dans les soins aux jeunes*	*Coopération dans les soins aux couvains*	*Division du travail reproducteur*	*Chevauchement des générations*
Vie solitaire							
Grégarité	+						
Subsocialité	+	+					
Colonialité	+	+	+				
Communalité	+	+	+	+			
Quasi socialité	+	+	+	+	+		
Semi socialité	+	+	+	+	+	+	
Eusocialité	+	+	+	+	+	+	+

b. *Les bénéfices de la vie sociale*

Pour qu'une organisation sociale perdure, elle doit procurer des bénéfices directs et/ou indirects à ses membres. La vie sociale apporte donc aux individus, une meilleure chance de survie ainsi qu'une meilleure valeur adaptative, appelée « ***fitness*** » (Krause and Ruxton 2002). En outre, la coopération entre les individus leur permet d'accroître leurs capacités d'adaptation suite à des variations environnementales. Effectivement, face à des contraintes écologiques, les grandes colonies d'insectes eusociaux sont celles qui résistent le mieux. Les fourmis *Temnothorax nylanderi* résistent davantage à une famine (Modlmeier et al. 2013) ou à des températures élevées (Molet et al. 2017). Chez les Apidés, la résistance aux pesticides serait liée à la taille de la colonie, avec une résistance plus élevée pour les grandes colonies (Rundlöf et al. 2015; Crall et al. 2019). Plus le degré social de l'insecte serait élevé, plus la taille de la colonie serait importante, et plus la résilience serait conséquente face à des pressions de sélection négatives (Imrit et al. 2020). Selon la théorie du « **Superorganism resilience** », les insectes eusociaux seraient les organismes les plus susceptibles de résister à des conditions

environnementales changeantes, grâce à un effet tampon entre la perte d'ouvrières et le maintien de la reproduction. Cette résilience serait aussi dépendante du cycle biologique et de la taille de la colonie (Straub et al. 2015).

L'apparentement entre individus peut également favoriser la coopération. En effet, Hamilton a proposé la notion d'« ***inclusive fitness*** », aussi appelé « ***kin selection*** », qui préconise de prendre en compte la corrélation génétique entre individus. L'inclusive fitness comprend ainsi les bénéfices directs et indirects qu'auront les individus, et le degré de parenté entre ces derniers. Cette théorie vise à expliquer les **comportements altruistes** chez les espèces eusociales où les ouvriers/ouvrières vont assurer les tâches ergonomiques, afin de maximiser leur fitness indirecte au profit de la reine (bénéfices directs pour elle). Hamilton envisage donc la présence de gènes responsables de comportements altruistes lorsqu'un individu va davantage aider un individu susceptible de porter ses gènes (Hamilton 1964; Nowak et al. 2010). Cette théorie pourrait alors expliquer de nombreux comportements dans les sociétés d'insectes. Les individus peuvent en effet davantage coopérer pour les soins aux couvains (Schultner et al. 2017), bénéficier d'une immunité sociale afin de se défendre collectivement contre les pathogènes et les parasites (Meunier 2015), ou réguler l'activité coloniale par exemple (Gordon 2019). C'est pourquoi, ils vont avoir plus de bénéfices à coopérer avec des individus apparentés, qu'avec des individus non apparentés.

c. *Les coûts de la vie sociale*

Toutefois, la vie sociale peut impliquer des coûts en termes de fitness, de par les conflits qui en découlent. La résolution de ces conflits est considérée comme un élément central dans l'évolution de la vie sociale des insectes (Ratnieks et al. 2006). Chez les insectes eusociaux, des conflits pour l'**accès à la reproduction** peuvent avoir lieu, malgré la présence d'individus spécialisés (Heinze 2004). En effet, les ouvrières, qui ne sont pas spécialisées dans la reproduction peuvent se mettre à pondre au détriment de la colonie (Ratnieks 1988).

Néanmoins, un comportement de contrôle et de gestion des pontes, appelé *« **policing** »*, chez les ouvrières va se mettre en place, afin de diminuer le conflit reproductif et d'augmenter la coopération entre les individus, en éliminant les œufs pondus par les ouvrières (Ratnieks and Wenseleers 2005).

D'autre part, dans les sociétés d'insectes, des **agents pathogènes** peuvent impacter l'organisation sociale de ces dernières, en modifiant leurs comportements de fourragement et de défense, par exemple (Feener 1988). L'**architecture du nid** ainsi que le **niveau d'activité** des ouvrières peuvent être considérés comme des facteurs importants dans la dynamique de transmission d'une épidémie. Effectivement, la propagation d'une maladie qui nécessite des contacts pour se transmettre est dépendante de la structure du nid, où les parois peuvent limiter le déplacement des individus et ainsi augmenter leur **promiscuité**. Il a été démontré que cette proximité entre les individus augmentait la probabilité de rencontrer un individu infecté, et que cela favoriserait la transmission de maladies (Otterstatter and Thomson 2007). De même, plus le taux d'activité serait élevé, plus l'épidémie pourrait se propager, mais une simple séparation spatiale permettrait de limiter sa propagation (Pie et al. 2004). Également, la plasticité comportementale des individus est essentielle pour limiter la propagation des pathogènes. Chez les fourmis *Lasius niger*, il a été mis en évidence que les ouvrières infectées et non infectées pouvaient modifier leur comportement afin de réduire le risque de contamination, en limitant la durée des contacts entre ces dernières et avec le couvain, mais aussi en ajustant la distance entre les membres de la colonie (Stroeymeyt et al. 2018). Enfin, le fort **apparentement génétique** entre les individus provoquerait une sensibilité plus élevée aux pathogènes (Cremer et al. 2007; Meunier 2015). Cependant, des réseaux d'interactions entre les individus visant à atténuer le phénomène de propagation des agents pathogènes peuvent être mis en place, afin de leur conférer une « **immunité organisationnelle** » (Stroeymeyt et al. 2014). Cette immunité, qui peut être prophylactique et/ou induite, correspond à un réseau d'interaction chez les insectes

sociaux qui est médié par 3 facteurs principaux : l'organisation spatiale de la colonie, les schémas d'activité temporelle et la modulation comportementale des interactions entre les ouvrières. Ces trois facteurs sont, en effet, structurés par la division du travail, l'architecture des nids et les patterns de mobilité des individus, ce qui permet de cloisonner des groupes d'individus en fonction de leur âge, tâche, ou niveau d'exposition au pathogène. Ainsi, ces différents facteurs découlant de la socialité, permettent aux insectes d'acquérir de l'immunité de manière individuelle et/ou collective.

B. La division du travail chez les insectes sociaux

L'une des transitions évolutives majeures qui caractérise le succès écologique des insectes sociaux dans de nombreuses niches écologiques concerne la **division du travail** (DOL, correspondant au terme anglais « Division Of Labour ») (Oster and Wilson 1978). Chez les insectes sociaux, la DOL est caractérisée par différentes activités réalisées simultanément au sein de la colonie par des groupes d'individus spécialisés dans une **tâche** donnée, afin d'augmenter la « *fitness* » de la colonie (Robinson 1992).

Cette DOL est régie par la présence de **castes**. Les individus issus de castes différentes sont donc susceptibles de réaliser des tâches différentes. C'est le cas par exemple de la **reproduction** avec des individus fertiles assignés à la reproduction (reine et mâle), et des individus stériles (ouvrier/ouvrière, soldat) qui quant à eux réalisent toutes les tâches d'entretien de la colonie. Ce modèle s'accompagne la plupart du temps de caractéristiques morphologiques et comportementales, où les reines se différencient nettement des ouvrières. Au sein de la caste des ouvriers/ouvrières, une pluralité de comportements peut être observée, avec des individus qui se spécialisent dans différentes tâches. Cela correspond à la **division du travail des ouvriers**. Hormis la reproduction, ils vont assurer le restant des tâches, dites ergonomiques, dans la colonie. Les ouvriers peuvent donc se spécialiser dans un sous-ensemble de tâches, tel que le soin au couvain, la construction du nid, la défense de la colonie, ou la recherche de

nourriture (Wilson 1971). Ce sous-ensemble de tâches peut varier d'un individu à l'autre au sein de la colonie, et en fonction des besoins de celle-ci.

Les tâches réalisées peuvent être attribuées selon deux modèles principaux (Oster and Wilson 1978). Tout d'abord, il y a le **polyéthisme temporel** ou **polyéthisme d'âge** lorsque l'exécution des tâches est corrélée à l'âge des individus. En effet, chez les abeilles mellifères, un polyéthisme d'âge a été décrit où les ouvrières effectuent des tâches distinctes en fonction de leur âge (Johnson 2008). Les ouvrières commencent donc par effectuer des tâches à l'intérieur de la colonie lorsqu'elles sont jeunes, puis elles vont prendre plus de risques en partant à la recherche de nourriture à l'extérieur de la ruche lorsqu'elles sont plus âgées (O'Donnell and Jeanne 1992; Robinson 1992). Le polyéthisme temporel est donc considéré comme un comportement adaptatif, où les individus les plus jeunes effectuent des tâches peu coûteuses et moins risquées à l'intérieur de la colonie contrairement à ceux qui sont plus âgés (Goldsby et al. 2012).

Concernant le second modèle sur la DOL, on parle de **polyéthisme morphologique,** lorsque l'accomplissement des tâches dépend cette fois-ci de la taille et/ou de la morphologie des individus. C'est le cas par exemple des fourmis *Pheidole*, où les ouvrières les plus grosses, dites « majors », travaillent à l'extérieur de la fourmilière et sont spécialisées dans le transport des grosses proies, alors que les plus petites, dites « minors » restent préférentiellement dans le nid et sont spécialisées dans le soin au couvain (Mertl and Traniello 2009).

Dans d'autres cas, la réalisation de la tâche ne dépend ni de l'âge, ni de la taille des ouvriers. On peut alors parler d'**allocation des tâches**, quand le nombre d'ouvriers réalisant une tâche est ajusté en fonction des besoins de la colonie (Gordon 1996). Il y a donc une grande **plasticité comportementale** de la DOL pouvant répondre à des changements **intrinsèques** (morphologie, variation génétique, ontogenèse) et **extrinsèques** (régime alimentaire, expérience de vie, stimulation chimique) (Duarte et al. 2011). Ces différents changements permettront donc aux

ouvriers de s'adapter pour réaliser une tâche à effectuer ou non (*Figure 1*) (Beshers and Fewell 2001).

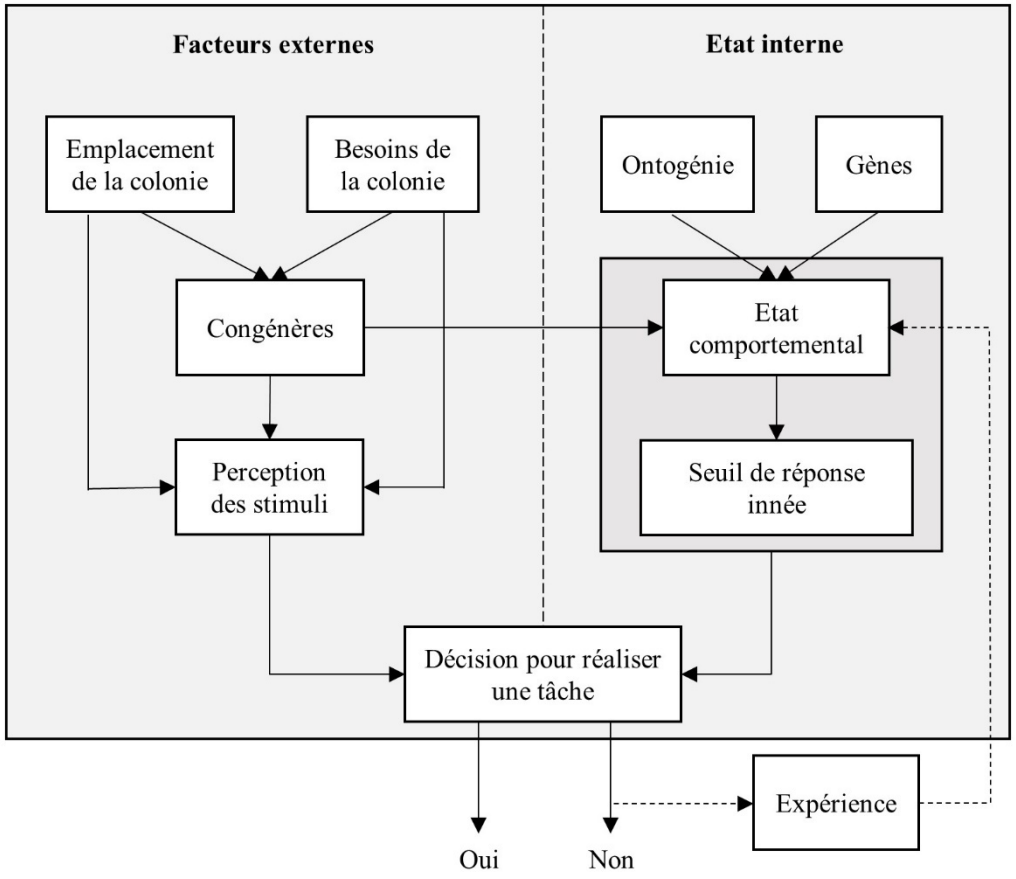


Figure 1. Facteurs internes et externes pouvant moduler l'attribution d'une tâche à réaliser par les ouvriers. Figure adaptée de Beshers and Fewell 2001.

C. Le potentiel invasif des insectes sociaux

La DOL a largement contribué au succès écologique des insectes sociaux. Cumulée à leur forte résilience face aux perturbations environnementales, les insectes sociaux ont colonisé l'ensemble du globe et sont même parfois devenus invasifs. La vie de groupe leur permet d'être moins impactés par la perte d'un congénère, mais également d'exploiter les ressources locales plus efficacement et de se défendre plus facilement (Moller 1996; Wilson and Hölldobler 2005). Dans la liste des 100 espèces vivantes les plus invasives au monde, 10 espèces d'insectes ont été recensées, dont sept sont des **espèces sociales**, principalement des fourmis (cinq espèces) (Lowe et al. 2000). Les fourmis peuvent donc être considérées comme les insectes les plus

envahissants au monde. Également, 147 espèces de fourmis ont été identifiées en dehors de leur aire d'origine (McGlynn 1999). Parmi elles, il a été mis en évidence que la fourmi d'Argentine *Linepithema humile*, présente sur 6 continents et de nombreuses îles océaniques, présentait un potentiel invasif très élevé de par son comportement social (Suarez et al. 2001). En effet, une étude comparant les populations natives et introduites a mis en évidence, une diminution des agressions intraspécifiques chez les populations introduites (Suarez et al. 1999). D'autres espèces sociales telles que les termites (Blumenfeld and Vargo 2020), les abeilles (Schneider et al. 2004), les guêpes (Rubinoff et al. 2010) ou les frelons (Lima et al. 2022) ont aussi été introduites sur de nouveaux territoires, où elles se sont établies. Ces invasions induisent de nombreux impacts négatifs tels que l'hybridation avec des espèces indigènes, des dommages écosystémiques, la transmission de pathogènes, des dommages économiques (Pimentel et al. 2005) et des problèmes de santé publique (Holway et al. 2002; Evans et al. 2013; Lester and Beggs 2019).

Les invasions biologiques sont définies par 3 phases : l'**introduction** dans une nouvelle aire géographique d'une espèce, son **établissement** dans celle-ci et enfin sa **propagation** localement (Kolar and Lodge 2001). De manière plus précise, les populations d'insectes sociaux sont quant à elles considérées comme invasives lorsqu'elles répondent à un modèle théorique d'invasion appelé « **Minimum Viable Beachhead Population** » (MVBP) (*Figure 2*) (Moller 1996). Ce modèle prédit qu'un individu introduit qui va survivre et établir une colonie peut être à l'origine d'une population invasive.

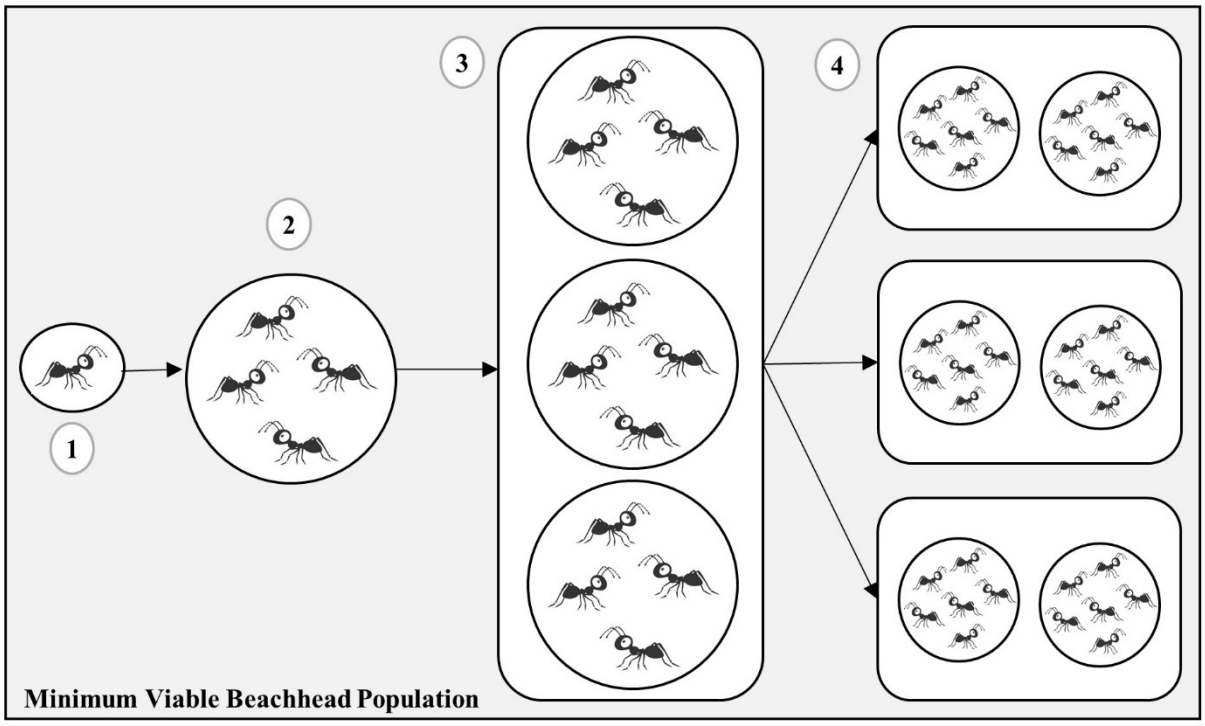


Figure 2. Modèle d'invasion théorique « Minimum Viable Beachhead Population ». Les différents numéros correspondent aux différentes phases d'invasion. 1 : phase d'introduction de l'insecte dans son nouvel environnement. 2 : établissement de la première colonie. 3 : établissement des colonies « Minimum Viable Beachhead Population ». 4 : établissement de la méta population. Entre les phases 2 et 3, ainsi qu'entre les phases 3 et 4, les individus issus de la colonie vont se reproduire, puis se disperser et survivre. Figure adaptée de Moller, 1996.

II. La communication chez les insectes

A. Quelques généralités

a. *Les modalités de la communication*

Le potentiel invasif des insectes est dû à divers facteurs vus précédemment, mais également à un système de communication très performant. Dans le règne vivant, percevoir et interagir avec son environnement proche est une nécessité primordiale. Que l'organisme soit unicellulaire, ou pluricellulaire, l'échange d'informations qui peut se réaliser entre des membres d'une même espèce et entre différentes espèces nécessite de pouvoir communiquer. D'une manière générale, la communication est définie comme un échange d'information, appelé « **signal** » entre un ou plusieurs individus. « L'**émetteur** » est considéré comme l'individu qui

transmet l'information, et le « **receveur** », comme celui qui reçoit l'information. Le système de communication nécessite donc des organes et/ou structures spécialisées afin d'émettre des signaux robustes au bruit et de percevoir ces informations. Différents modes de communication ont été décrits et peuvent utiliser des signaux **acoustiques, vibrationnels**, **tactiles**, **visuels** ou **chimiques**. Ces différents signaux permettent aux individus de se renseigner de manière directe ou indirecte sur des paramètres environnementaux, ou sur des individus proches. De nombreux signaux peuvent être perçus dans l'environnement, c'est pourquoi les individus ont évolué avec des structures sensorielles et nerveuses sélectionnant ceux qui représentent un intérêt personnel potentiel. Le signal sera donc ensuite traduit comme une **information** afin de mettre en place ou d'adapter un **comportement spécifique**. Les signaux ne représentent pas systématiquement des informations fiables, l'individu va donc devoir intégrer, associer et interpréter différents types de signaux afin de produire une réponse comportementale appropriée à ce message (Bradbury and Vehrencamp 2011; Darrouzet and Albouy 2022).

b. *Les fonctions de la communication*

Depuis de nombreuses années, la communication chez les insectes fascine. L'exemple le plus connu concerne la danse des abeilles, qui a été décrite par Karl Von Frisch en 1967. Dans cet exemple, la capacité de communication des insectes, et plus particulièrement la capacité des abeilles à communiquer a été mise en évidence (Von Frisch 1967).

Chez les insectes, différents types de signaux peuvent être employés dans divers contextes afin de se reproduire, délimiter son territoire, chasser, faire fuir un prédateur… Les signaux impliqués dans la communication peuvent donc avoir **différentes fonctions**. Tout d'abord, les signaux peuvent être utilisés pour attirer de potentiels partenaires sexuels, et donc permettre la **reproduction**. C'est le cas par exemple des femelles papillons *Bicyclus anynana* qui utilisent à la fois des stimuli visuels et olfactifs afin de choisir un mâle pour s'accoupler (Costanzo and Monteiro 2007). Chez les criquets *Cyphoderris strepitans*, les signaux

acoustiques sont quant à eux utilisés par les femelles afin de localiser les mâles (Snedden and Sakaluk 1992). En cas de **compétition** pour l'accès aux partenaires sexuels, territoires ou ressources, des signaux peuvent aussi intervenir. C'est le cas chez des Orthoptères (grillons et sauterelles), où le choix du partenaire sexuel, ainsi que l'établissement et le maintien des territoires sont médiés par des signaux acoustiques (Thiele and Bailey 1980; Searcy and Andersson 1986; Hall and Robinson 2021). En ce qui concerne la **prédation**, des signaux peuvent être émis afin de prévenir les congénères d'un danger et/ou tenter de dissuader les prédateurs. L'aposématisme est une stratégie adaptative qui permet aux insectes d'émettre des signaux d'avertissement de différents types (visuels, olfactifs ou sonores) afin de dissuader les prédateurs. Cette stratégie bénéfique à l'émetteur et au receveur, permet d'informer au prédateur que l'individu ne doit pas être consommé. De nombreux insectes peuvent alors utiliser ces signaux aposématiques afin de prévenir de leur non-appétence et *in fine* de dissuader les prédateurs de les consommer (Mappes et al. 2005). Pour citer une autre stratégie de **défense** en cas de prédation, les abeilles mellifères peuvent produire une phéromone d'alarme. Ce messager chimique indique aux congénères un état d'alerte afin de déclencher des comportements d'agression et de défense de la colonie face aux prédateurs. Cette phéromone, qui n'est pas spécifique à l'espèce, peut être perçue par le genre *Apis*, mais également par des prédateurs (Wang and Tan 2019). Également, connaître la **localisation des ressources** est une composante essentielle chez les insectes, où divers signaux peuvent être employés. L'exemple le plus connu concerne la fameuse danse des abeilles *Apis mellifera* qui se réalise par le biais d'une communication visuelle afin de décrire la distance et la direction de la ressource aux congénères (Von Frisch 1967). Deux formes de danse peuvent être utilisées dans cet échange d'informations ; la danse ronde pour indiquer une ressource proche et la danse ondulatoire pour indiquer une ressource éloignée (Riley et al. 2005). Enfin, au sein d'une colonie, des signaux peuvent être utilisés pour la **reconnaissance de la parenté** afin de distinguer les intrus, d'éviter

la consanguinité et de maintenir une cohésion sociale. Des molécules chimiques appelées hydrocarbures cuticulaires (CHCs, correspondant au terme anglais « Cuticular Hydrocarbon Compounds ») peuvent être utilisés chez les fourmis par exemple (Sturgis and Gordon 2012). De même, des indices visuels peuvent aussi être employés, comme c'est le cas chez les guêpes *Polistes fuscatus*, où les marques faciales et abdominales jaunes sont des indicateurs d'identité individuelle (Tibbetts 2002).

B. La communication chimique

a. *Généralités*

Le mode de communication le plus répandu et le plus ancien chez les insectes est la communication chimique (Bradbury and Vehrencamp 2011; Wyatt 2014). Dans le domaine de l'écologie chimique, les signaux chimiques impliqués dans des phénomènes de communication correspondent à des **substances dites sémiochimiques**. Ces dernières correspondent à un signal chimique émis par un organisme vivant dans l'environnement, et qui va déclencher chez un organisme receveur une réponse comportementale ou physiologique. Lorsque ces substances agissent au sein d'une espèce, on parle de **phéromones** ; et lorsqu'elles agissent entre plusieurs espèces, on parle de **médiateurs allélochimiques**. Les phéromones se distinguent en deux types, celles qui modifient le comportement qu'on appelle **phéromones initiatrices**, et celles qui modifient la physiologie qu'on appelle **phéromones modificatrices**. Parmi les médiateurs allélochimiques, trois types se distinguent. Lorsque la substance émise est bénéfique pour l'émetteur, on parle d'**allomone**, lorsqu'elle est bénéfique au receveur, on parle de **kairomone**, et enfin, lorsqu'elle est bénéfique à la fois pour l'émetteur et le receveur, on parle cette fois-ci de **synomone** (*Figure 3*) (Karlson and Lüscher 1959; Wilson 1963; Brossut 1996).

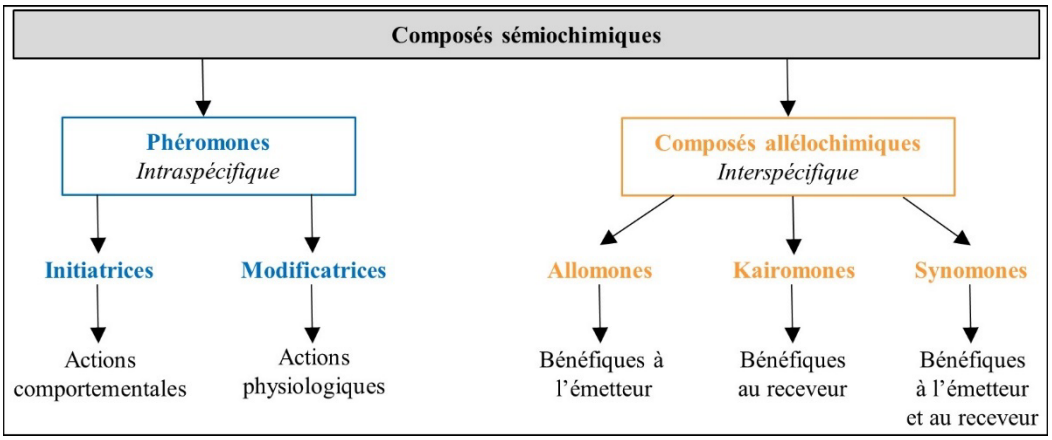


Figure 3. Représentation des différentes catégories de médiateurs chimiques. Figure adaptée de Brossut, 1996.

Si ce mode de communication a persisté au cours de l'évolution, et qu'il est présent dans de nombreux groupes taxonomiques, cela suggère ainsi qu'il est avantageux. Wyatt et al. ont alors proposé en 2014, une théorie pour expliquer **l'évolution de la communication chimique** chez les insectes, où l'émetteur aurait développé des signaux chimiques plus élaborés et fiables afin de transférer une information à un receveur donné. On parle de « véritable communication » (*Figure 4*) (Wyatt 2014).

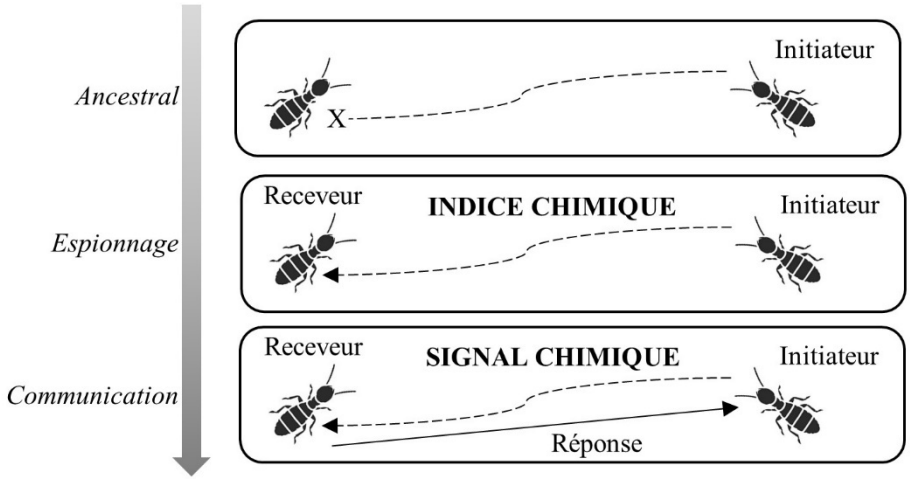


Figure 4. Représentation des différentes étapes de l'évolution de la communication chimique chez les insectes. L'état ancestral correspond à l'étape où les molécules émises étaient involontaires et non perçues par les autres individus. L'espionnage, appelé « spying », est apparu ensuite lorsque l'initiateur émettait des indices chimiques perçus par un receveur, de manière involontaire (*cue*). Enfin, la communication est apparue, lorsque les individus ont développé des signaux chimiques complexes permettant de transmettre une information au receveur qui pouvait aussi répondre à ce signal. Figure adaptée de Wyatt 2014.

Enfin, la **pluralité** des signaux chimiques permet d'améliorer l'efficacité des systèmes de communication. Ces médiateurs chimiques présentent des caractéristiques différentes. Ils peuvent être **plus ou moins volatiles**, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, principalement le poids et la taille des molécules, mais aussi suivant le substrat qui les supporte ou transporte. Également, ils peuvent avoir **diverses fonctions**. C'est le cas par exemple de la classe des terpénoïdes, qui comprend plus de 40 000 substances avec des fonctions d'attraction ou de répulsion pour les insectes (Theis and Lerdau 2003).

b. *Production, dissémination et détection des composés sémiochimiques*

Chez les insectes, les composés sémiochimiques sont synthétisés dans une variété de glandes localisées dans différentes parties du corps (*Figure 5*). Ces **glandes**, composées de cellules sécrétrices, peuvent être de deux types : les **glandes endocrines** et les **glandes exocrines**. On parle de glande endocrine lorsque les substances chimiques sont libérées dans le corps et de glandes exocrines lorsqu'elles sont libérées à l'extérieur du corps. Ces glandes sécrétrices (glandes de Dufour, à poison, mandibulaires, post pharyngales…) produisent des composés chimiques à partir de divers substrats comme des « déchets » métaboliques rejetés par d'autres cellules de l'organisme, de composés issus de plantes ou de bactéries… (Bradbury and Vehrencamp 2011; Darrouzet and Albouy 2022). Chez les fourmis *Oecophylla smaragdina*, ces glandes sécrétrices qui sont présentes en très grand nombre peuvent produire des substances chimiques différentes avec chacune une fonction spécifique (Kempraj et al. 2020). Par exemple, des glandes contenues dans leur tête produisent des acides gras connus pour leurs propriétés antifongiques (Pohl et al. 2011). Elles produisent également beaucoup de composés chimiques volatiles utilisés dans la communication et la défense (Billen 2009). La glande de Dufour et la glande à venin, situées quant à elles dans le dernier segment abdominal, produisent beaucoup d'hydrocarbures et d'alcools (Kempraj et al. 2020). Les produits chimiques sécrétés par ces glandes peuvent être principalement utilisés comme des signaux

d'alarme, mais aussi pour la communication et le marquage du territoire (Bradshaw et al. 1979a).

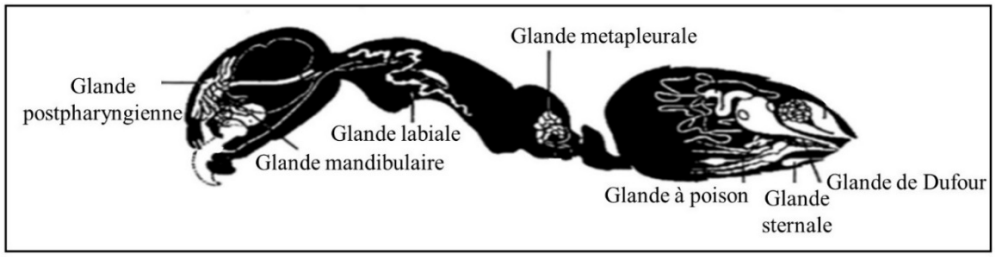


Figure 5. Localisation des glandes exocrines chez la fourmi. Figure adaptée de Aron and Passera 2009.

La dissémination de ces molécules peut se faire selon différentes méthodes. Une méthode fréquemment utilisée par les insectes consiste à relâcher les substances chimiques dans l'air ou dans l'eau, en évasant leur glande, ou en exposant le tissu glandulaire afin de permettre une évaporation progressive. Pour ce faire, les insectes peuvent prendre une **posture spécifique** appelée « *pushup stance* » qui permet par exemple aux mâles coléoptères *Neoclytus acuminatus acuminatus*, de libérer une phéromone d'agrégation (Lacey et al. 2007). Sur de plus courtes distances, les insectes peuvent aussi **pulvériser** des substances chimiques. C'est le cas chez des espèces de termites où ces substances peuvent être relâchées par transpiration, autophyse, morsure, jet… (Noirot and Darlington 2000). De nombreux insectes peuvent aussi libérer et **diffuser** des substances chimiques grâce aux structures présentent sur leurs corps. C'est le cas de certains papillons mâles qui possèdent des poils afin de diffuser une odeur utilisée dans la reconnaissance territoriale (Pliske 1975). La plupart des insectes sociaux utilisent quant à eux le **toilettage**, les **contacts physiques**, la **trophallaxie** ou bien le **substrat du nid** afin de diffuser leur signature chimique cuticulaire (CHCs) (Richard and Hunt 2013). Les substances chimiques peuvent également être déposées sur une surface solide, comme pour la phéromone de piste de fourmis, afin d'indiquer un itinéraire chimique à suivre pour les membres de la colonie (Czaczkes et al. 2015).

Pour percevoir ces substances chimiques, les insectes sont dotés d'un **système olfactif** très performant. Avec la gustation, l'olfaction est la modalité sensorielle qui permet aux insectes d'analyser des molécules chimiques présentes dans leur environnement. La chémoréception des insectes implique donc des **organes chimio-sensoriels olfactifs** et de **contacts** (Bradbury and Vehrencamp 2011). Grâce au comportement d'antennation, les insectes peuvent détecter les substances chimiques émises dans l'environnement ou sur un individu par un simple contact physique antennaire. Effectivement, les **antennes** portent des **récepteurs spécifiques** sur lesquels vont se lier les odeurs. Cette interaction va être traduite en activité électrique neuronale, puis traitée par le système nerveux central afin d'engendrer une réponse comportementale et physiologique. Les **récepteurs olfactifs**, appelés **antennes**, sont couvertes de **sensilles** contenant des **neurones sensoriels olfactifs** (**ORNs**, correspondant au terme anglais « Olfactory Receptor Neurons ») qui vont traduire le signal chimique en une **réponse électrique**, puis transmettre l'information olfactive aux **lobes antennaires** avant d'être traitée par les centres supérieurs (Jacquin-Joly and Merlin 2004; Mizunami et al. 2010; Renou and Anton 2020). Les sensilles sont des structures très diversifiées à la fois morphologiquement et structuralement (Queiroz Fialho et al. 2014; Elgar et al. 2018). Les molécules odorantes rentrent par les pores cuticulaires de la sensille, puis traversent la lymphe aqueuse. Les molécules vont alors se lier à des **protéines de liaison odorante** (**OBPs** , corrrespondant au terme anglais « Odorant Binding Proteins ») afin d'atteindre les ORNs sur la dendrite du neurone olfactif, ce qui provoque une cascade d'événements conduisant à une activité nerveuse provoquant ensuite une réponse comportementale (Jacquin-Joly and Merlin 2004; Sun et al. 2018) (*Figure 6*).

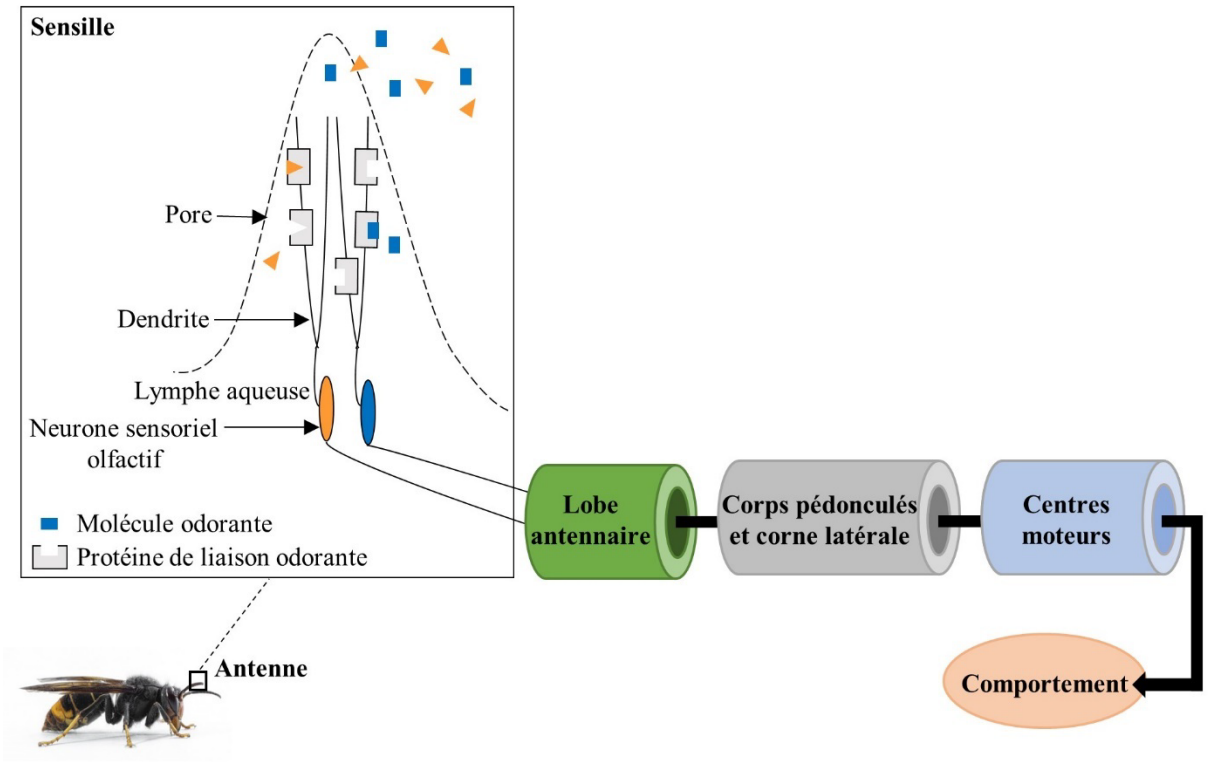


Figure 6. Schéma fortement simplifié du système olfactif. Les molécules odorantes passent par les pores de la sensille. Elles vont ensuite se lier aux protéines de liaisons odorantes situées sur les dendrites des neurones sensoriels olfactifs. Après fixation sur le récepteur, les protéines vont dégrader le signal. Le signal va être traduit en réponse électrique puis transmis au niveau des glomérules dans le lobe antennaire. Le signal sera ensuite transporté par des neurones de projection jusqu'au système nerveux central, ce qui déclenchera une réponse comportementale. Chaque dendrite possède des protéines de liaison odorantes spécifiques.

c. *Evolution sociale et communication chimique*

L'évolution de la socialité et l'apparition de sociétés parfois très complexes ont notamment été permises grâce à une évolution de la communication, et par conséquent, l'implication de différents modes et signaux de communication. C'est pourquoi, en fonction du type de socialité, les systèmes de communication peuvent être différemment utilisés par les insectes, que ce soit pour la reproduction, les soins parentaux, la défense ou bien la communication intra-coloniale (Leonhardt et al. 2016).

Toutefois, il a été démontré que la complexité des signaux chimiques n'était pas liée à la socialité de l'insecte. En effet, l'analyse de 241 espèces d'Hyménoptères solitaires et sociales, n'a pas décelé de différence concernant la complexité des profils cuticulaires (CHCs) entre ces

espèces. En effet, toutes les familles chimiques de cette signature (alcanes, alcanes méthylés et alcènes) étaient présentes dès le début de l'histoire évolutive des Hyménoptères (Kather and Martin 2015). Malgré tout, les espèces sociales auraient un **système sensoriel plus élaboré** et pourraient davantage détecter les signaux chimiques émis. Cela a été mis en évidence en comparant la densité de sensilles des antennes chez 36 espèces d'abeilles solitaires et sociales. Les abeilles sociales ont investi dans un plus grand nombre de sensilles afin d'augmenter le nombre de récepteurs olfactifs et donc d'obtenir plus rapidement un signal plus précis face aux signaux sociaux. À l'inverse, les espèces solitaires qui n'ont quant à elles pas besoin de percevoir ces signaux sociaux, n'ont pas développé un système de sensilles aussi complexe et coûteux (Wittwer et al. 2017).

Dans la suite de cette thèse, je me consacrerais exclusivement aux insectes eusociaux.

d. *La communication intra-coloniale chez les insectes eusociaux*

Le succès de ces insectes eusociaux est largement dû à une communication et une régulation sociale efficaces. L'organisation sociale nécessite un système de communication intra-colonial performant. En effet, la socialité étant basée sur la coopération, il est nécessaire que les insectes maximisent leur travail au profit de l'ensemble des individus de la colonie. Des substances sémiochimiques vont alors jouer un rôle sur le comportement social et l'homéostasie coloniale[2]. Ces composés sémiochimiques, qui sont considérés comme le moyen de communication le plus utilisé chez les insectes eusociaux, vont permettre de garantir une cohésion sociale et de discriminer les congénères des intrus à la colonie. Cette capacité de reconnaissance permet d'engendrer des comportements à la fois spécifiques et ciblés. Les ouvriers/ouvrières pourraient discriminer les individus rencontrés de deux manières (Richard and Hunt 2013). La première manière consisterait à discriminer les congénères des intrus en

[2]L'homéostasie coloniale correspond à un environnement colonial stable.

comparant l'odeur perçue avec l'odeur coloniale, et ainsi rejeter les individus ne portant pas d'odeur familière, c'est le **système « désirable – présent »**. Cela a été démontré chez la fourmi *Camponotus herculeanus*, où l'ajout expérimental de CHCs provoque des agressions (Guerrieri et al. 2009). La seconde manière est quant à elle basée sur un **système « indésirable – absent »**, où l'odeur perçue est comparée à des indices indésirables indépendants de la présence d'odeurs désirables. En effet, chez l'abeille sans dard, *Frieseomelitta varia*, les ouvrières qui avaient acquis des substances chimiques d'ouvrières ne faisant pas partie de leur colonie en plus de leur odeur coloniale, étaient rejetées par leur colonie initiale (Couvillon and Ratnieks 2008).

e. *Médiateurs chimiques chez les insectes eusociaux*

L'organisation sociale des insectes nécessite la mise en place de moyens de communication pour de nombreux comportements, tels que l'accès à la reproduction, la défense de la colonie, le recrutement de congénères, la localisation de ressources… Différentes substances sémiochimiques peuvent alors être utilisées. Parmi elles, les **CHCs** ont été décrits chez de nombreuses espèces et sont principalement utilisés pour discriminer les individus (Martin and Drijfhout 2009; Kather and Martin 2015). Également, certains **peptides** et **protéines**, présents sur la cuticule des insectes peuvent aussi jouer un rôle de phéromone. C'est le cas par exemple chez les termites *Reticulitermes flavipes* où des protéines présentes chez les reproducteurs induisent un comportement vibratoire impliqué dans la signalisation de la présence de reproducteurs chez les ouvriers (Ruhland et al. 2023). Certaines phéromones sont utilisées dans des contextes particuliers. On retrouve la **phéromone sexuelle**, qui peut être utilisée chez certaines espèces sociales pour attirer les mâles, comme c'est le cas par exemple chez le genre *Vespa* (Ono and Sasaki 1987). On retrouve également la **phéromone d'alarme**, qui est quant à elle une composante essentielle à la survie de la colonie. En effet, cette dernière est utilisée en cas de danger, afin de permettre le recrutement de congénères et d'induire des comportements de défense vis-à-vis d'un individu étranger à la colonie pouvant représenter un

risque pour celle-ci (Boch and Shearer 1971; Bruschini et al. 2008b). Une autre phéromone essentielle à l'organisation coloniale est la **phéromone de piste**. Cette phéromone, très documentée chez les fourmis, est utilisée par ces dernières comme un itinéraire chimique (trail-following) à suivre afin de trouver une source de nourriture (David Morgan 2009; Czaczkes et al. 2015). Enfin, la **phéromone de reine** est la phéromone clé impliquée dans la régulation de la division du travail des reproducteurs chez les insectes eusociaux, c'est-à-dire la séparation des castes entre des femelles fertiles et des ouvrières stériles. C'est le cas par exemple pour les abeilles domestiques, où cette phéromone provoque la stérilité des ouvrières en inhibant leur développement ovarien (Slessor et al. 2005).

III. Les Hydrocarbures Cuticulaires (CHCs) chez les insectes eusociaux

A. Médiateurs

Parmi cette diversité de médiateurs chimiques, les CHCs sont des composés clés de la communication chimique chez les insectes eusociaux. Ce sont des molécules présentes sur la **cuticule** des insectes. Ils sont connus pour jouer de nombreux rôles chez les insectes. Utilisés contre la **dessiccation** (Gibbs 1998, 2002), les CHCs peuvent aussi être impliqués dans un système de communication chimique où des composés **peu volatiles** sont requis. Ces substances sémiochimiques peuvent aussi être considérées comme la **signature chimique** des insectes. Effectivement, elles peuvent être utilisées comme des « phéromones de contact » et impliquées dans des processus de reconnaissances inter- et intra- spécifiques (Blomquist and Bagnères 2010a). Ces substances chimiques peuvent être utilisées dans la **reconnaissance** des membres de la colonie (Van Zweden and D'Ettorre 2010), et être considérées comme une sorte de « visa » afin de transmettre l'identité de l'individu à ses congénères (Fresneau and Errard 1994; Soroker et al. 2003). Les CHCs permettent de discriminer les individus en fonction de

leur **espèce** (Berville et al. 2013), **colonie** (D'Ettorre and Lenoir 2010), **genre** (Thomas and Simmons 2008), **caste** (Bagnères et al. 1998), et **tâche** (Kaib et al. 2000; Rahman et al. 2016).

Les CHCs sont constitués d'un mélange de composés à longue chaîne d'atomes de carbones, qui peuvent être saturés ou non (double liaison carbone - carbone), mais aussi modifiés par l'introduction de groupes méthylés. Ces propriétés structurelles induisent des profils chimiques complexes avec des différences fonctionnelles et des capacités d'imperméabilisation différentes (Martin and Drijfhout 2009; Blomquist and Bagnères 2010a; Ginzel and Blomquist 2016). Différentes familles chimiques se distinguent, telles que les alcanes linéaires, les alcanes méthylés et les alcènes. Suivant la position d'un groupement méthylé ou d'une double liaison, la transmission d'informations peut être plus ou moins complexe, tout comme la protection contre la dessication plus ou moins importante (Châline et al. 2005; Dani et al. 2005; Guerrieri et al. 2009). Cela suggère ainsi un compromis entre la fonction de communication et d'imperméabilisation (Chung and Carroll 2015; Menzel et al. 2017). Toutefois, ce compromis est à ce jour peu étudié dans la littérature.

Les **alcanes linéaires** à longue chaîne constituent la majorité du profil cuticulaire des insectes. Ces molécules sont principalement utilisées dans les phénomènes d'imperméabilisation pour lutter contre la dessiccation. En effet, la plupart des insectes vivant dans des régions climatiques chaudes ont tendance à produire une grande quantité d'alcanes linéaires, contrairement aux espèces vivant dans des régions climatiques froides qui produisent davantage d'hydrocarbures insaturés (Wagner et al. 1998, 2001). Cependant, les alcanes linéaires seraient peu utilisés dans la reconnaissance des individus chez les Vespidés et les Apidés. En effet, il a été démontré chez les abeilles *Apis mellifera* et les guêpes *Polistes dominulus*, que des changements de profils cuticulaires en n-alcanes n'induisaient pas de changements d'identité (Dani et al. 2001; Martin et al. 2004). De plus, au niveau olfactif, les abeilles ne répondent pas aux substances contenant comme alcanes du heneicosane, tricosane et pentacosane (Pickett et al. 1982), indiquant ainsi

qu'elles n'étaient probablement pas perçues, et n'étaient donc pas utilisées dans la reconnaissance des congénères. Toutefois, chez les fourmis, les alcanes linéaires seraient utilisés comme des indices chimiques afin de transmettre un message spécifique. Ils peuvent être utilisés comme une substance d'alarme (Hölldobler and Wilson 1990), un signal de fertilité et d'accouplement (Hora et al. 2008), pour moduler le nombre d'individus assignés à une tâche (Greene and Gordon 2003) ou identifier la présence d'ouvrières reproductrices considérées comme des individus tricheurs (Smith et al. 2009).

Les **alcanes méthylés** sont plus coûteux à produire, notamment de par l'ajout de groupements chimiques sur la chaîne carbonée. Ces CHCs sont très diversifiés et peuvent donc jouer différents rôles. Ces composés peuvent être impliqués dans la reconnaissance coloniale, la reconnaissance des congénères et les signaux de fertilité. Pour citer quelques exemples, les guêpes *Polistes dominulus* se font attaquer par les membres de leur colonie lorsque leur profil cuticulaire en alcanes méthylés a été modifié (Dani et al. 2001), contrairement aux alcanes linéaires. De même, les fourmis *Formica* ont une signature coloniale qui se différencie grâce à leurs proportions relatives en alcanes diméthylés (Martin et al. 2008a). Chez les fourmis *Camponotus floridanus*, il a été démontré que lorsque les œufs des ouvrières étaient supplémentés par un apport en CHCs en provenance des reines, leur destruction était atténuée. Les profils cuticulaires des œufs de reines et d'ouvrières étant significativement différents pour de nombreux alcanes méthylés, cela suggère donc la présence d'un signal de fertilité chez les reines, limitant ainsi la reproduction des ouvrières (Endler et al. 2004).

Les **alcènes** se diversifient quant à eux en fonction de leur nombre de double liaison carbone-carbone. On parle d'alcène monoène lorsqu'il y a une seule double liaison, d'alcène diène lorsqu'il y en a deux, d'alcène triène lorsqu'il y en a trois et ainsi de suite. Ces CHCs peuvent également être méthylés ou non. Les alcènes sont des molécules plus volatiles que les autres CHCs. L'introduction de doubles liaisons augmente la complexité structurelle et

tridimensionnelle (la double liaison est un point de rigidité au sein de la molécule entraînant la production d'isomères, c'est-à-dire des molécules différentes selon la position des chaînes carbonées vis-à-vis du plan formé par la double liaison), et diminue le point de fusion de la molécule. C'est pourquoi, plus il y aura de doubles liaisons dans la molécule, moins la molécule sera impliquée dans la protection contre la dessication. Cependant, ces molécules avec une richesse structurale plus importante, seront probablement davantage impliquées dans la communication. Les alcènes peuvent donc avoir différentes fonctions (Drijfhout et al. 2009). Ces CHCs peuvent être considérés comme des indices chimiques importants dans la reconnaissance des congénères (Dani et al. 2001). Ils peuvent également être utilisés comme phéromone sexuelle. C'est le cas par exemple chez l'abeille *Megachile rotundata*, où les femelles vierges se distinguent des autres grâce à leur proportion en monoènes, et seront donc ainsi davantage choisies par les mâles (Paulmier et al. 1999). De la même manière, chez les guêpes *Eurytoma amygdali*, il a été démontré que les mâles répondaient davantage aux extraits de femelles contenant des alcadiènes (Krokos et al. 2001). Également, ces molécules peuvent agir comme des répulsifs. En effet, les fourmis parasites *Formicoxenus nitidulus*, qui possèdent de grandes quantités d'alcadiènes sur leur profil cuticulaire, sont très peu capturées par la fourmi hôte *Formica* et immédiatement relâchées lorsque c'est le cas (Martin et al. 2007). Ce résultat a été confirmé par Martin et al., en 2008, lorsque des proies de fourmis *Formica* étaient relâchées après avoir été supplémentées en extraits cuticulaires de *Formicoxenus nitidulus*.

La signature chimique des insectes peut donc être très complexe, avec des propriétés structurelles différentes, en induisant ainsi des utilisations et donc des comportements différents suivant les espèces. Enfin, de nombreuses études ont démontré que ce profil cuticulaire était **dynamique**, et pouvait varier qualitativement et quantitativement (Bonavita-Cougourdan et al. 1993; Lucas et al. 2002; Blomquist and Ginzel 2021). Cet aspect sera traité dans la partie III.D de cette introduction.

B. Les voies de biosynthèse

Les CHCs sont des molécules qui peuvent présenter des variations dans la longueur de la chaîne de carbones, du nombre et la position des ramifications méthylées et des doubles liaisons, ainsi que de la chiralité[3] des composés méthylés et la stéréochimie E/Z [4]des doubles liaisons carbone – carbone (Blomquist and Bagnères 2010b). Ces CHCs présents sur la cuticule des insectes sont produits dans les **oenocytes** à partir de la voie de biosynthèse des acides gras et inclue différentes étapes. L'**acétyl-CoA**, formé à partir de l'acétate et d'un coenzyme A, est un précurseur d'acide gras composé d'une longue chaîne, pouvant parfois être saturée et/ou méthylée. L'acétyl-CoA chez les insectes est converti en **alcool** puis oxydé en **aldéhyde**. Il subit ensuite une **décarboxylation** qui le converti en hydrocarbure, en relarguant un dioxyde de carbone, grâce à une enzyme à **cytochrome P450** qui nécessite du **NADPH** et de l'**oxygène**. De manière plus générale, ce précurseur peut alors emprunter **trois cheminements** différents afin d'obtenir des alcanes linéaires, des alcanes méthylés ou des alcènes, de longueurs différentes (*Figure 7*). Tout au long de la synthèse, une série d'**enzymes** va jouer un rôle afin d'allonger la chaîne hydrocarbonée (élongases) ou de rajouter des insaturations (désaturases). Pour produire les alcanes linéaires, l'allongement de l'acide gras est réalisé par des élongases, suivi par une décarboxylation. La production d'alcènes se fait par l'action d'élongases puis de désaturases, suivi ensuite par une décarboxylation. Enfin, la production d'alcanes branchés se fait par l'apport de substrats issus du métabolisme des acides aminés qui sera ensuite suivi par une élongation et une décarboxylation. Pour terminer, les CHCs seront transportés dans l'**hémolymphe** jusqu'à la cuticule des insectes grâce à des lipoprotéines de transport appelées

[3]Chiralité : Un composé chimique est chiral lorsque son image n'est pas superposable dans un miroir. Une molécule chimique est considérée comme chirale lorsqu'elle possède deux formes énantiomères.
[4]Stéréochimie E/Z : La stéréochimie concerne l'arrangement des atomes. Les molécules chimiques ont les mêmes formules brutes et semi-développées, mais leur configuration spatiale est différente. Les isomères E/Z font partie des stéréo-isomères de configuration. Les molécules présentent une double liaison carbone-carbone formant un plan fixe dans l'espace, et les groupements de part et d'autre de la double liaison sont soit au-dessus ou en dessous du plan et donnent de fait deux molécules différentes en structure tridimensionnelle.

lipophorines (Howard and Blomquist 2005; Bagnères and Blomquist 2010; Blomquist and Ginzel 2021).

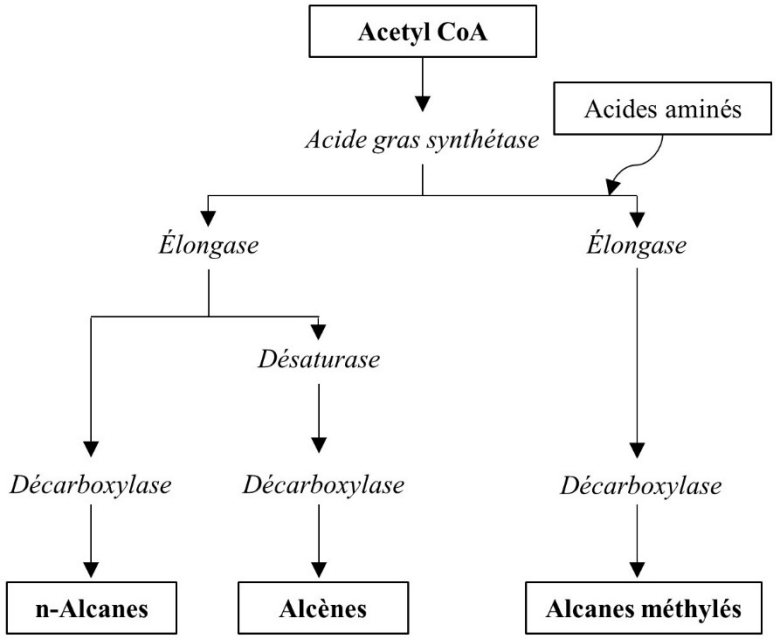


Figure 7. Biosynthèse simplifiée des hydrocarbures cuticulaires. Les hydrocarbures sont fabriqués dans les œnocytes à partir de précurseurs d'acides gras (Acétyl-CoA). Trois voies permettent de donner des n-alcanes, des alcènes ou des alcanes méthylés. Figure adaptée de Kent et al. 2008.

C. La signature coloniale

Comme expliqué précédemment, les CHCs peuvent être impliqués dans des phénomènes de reconnaissance entre les individus, mais aussi responsables de la signature coloniale. La coopération entre les individus apparentés est à la base de la socialité chez les insectes sociaux. C'est pourquoi, la reconnaissance des congénères, qui est médiée par la communication chimique, est l'un des mécanismes clés à la compréhension du comportement altruiste dans les sociétés d'insectes. Lorsqu'ils se rencontrent, les insectes peuvent comparer leurs odeurs via des contacts antennaires. L'odeur coloniale est homogénéisée au cours du temps par les membres de la colonie grâce à divers comportements d'échanges pour que chaque individu possède une odeur commune. L'odeur coloniale est donc composée de l'ensemble des odeurs individuelles qui sont quant à elles variables entre les individus. C'est pourquoi, afin de ne pas être rejetés par la colonie, les insectes doivent acquérir, maintenir et mettre à jour cette

odeur continuellement. En 1979, Crozier et Dix ont proposé deux modèles de transfert d'indices olfactifs génétiquement déterminés entre les individus. Le premier modèle appelé « **Gestalt model** » suggère que tous les membres de la colonie échangent leurs CHCs grâce à la trophallaxie et au toilettage individuel et social, de sorte à obtenir une odeur commune appelée odeur gestalt. Le second modèle appelé « **Individualistic model** » suggère quant à lui que chaque membre de la colonie garde sa propre odeur et ne la partage pas avec les membres de sa colonie. Il n'y a donc pas de transfert d'odeurs dans ce dernier modèle. Depuis, de nombreuses études ont confirmé l'existence du modèle Gestalt, notamment chez les fourmis où l'échange de CHCs se fait par transfert de nourriture liquide et toilettage (Soroker et al. 1994; Dahbi et al. 1999; Lahav et al. 2001; LeBoeuf et al. 2016). L'abondance des échanges d'odeurs dépend de la méthode de transfert (Soroker et al. 1995; Van Zweden and D'Ettorre 2010). Effectivement, chez les espèces présentant beaucoup d'échanges de fluides via la trophallaxie, les échanges d'odeurs sont alors intenses et rapides. Inversement, les espèces qui ne pratiquent pas la trophallaxie, mais qui exercent des comportements intensifs de toilettage ont des échanges d'odeurs plus modérés. Enfin, les espèces qui ne pratiquent pas la trophallaxie et très peu de toilettage ont un faible transfert d'odeurs entre les individus. D'autre part, il a également été démontré chez les fourmis *Rhytidoponera confusa* que les individus pouvaient acquérir l'odeur coloniale en provenance des matériaux du nid (Crosland 1989). Le modèle Gestalt permettrait donc aux insectes d'utiliser l'odeur coloniale afin de discriminer les membres de la colonie, des intrus (Hefetz 2007). Enfin, le concept d'« **insignifiance chimique cuticulaire** » (Lenoir et al. 1999; Lorenzi and D'Ettorre 2020) indique que les individus nouvellement émergés posséderaient peu de caractéristiques chimiques sur leur cuticule afin d'être acceptés par la colonie initiale, et cela serait suivi d'une période d'intégration, où ils pourraient acquérir l'odeur coloniale.

L'odeur coloniale peut également être usurpée par des parasites. En effet, les parasites mènent une course aux armements afin de co-évoluer avec leurs hôtes. Pour cela, les parasites doivent donc maîtriser les moyens de reconnaissance de leurs hôtes. C'est pourquoi, chez la plupart des insectes, lorsque deux espèces d'insectes cohabitent, leurs profils cuticulaires sont semblables. Il y a donc ce que l'on appelle un **mimétisme chimique** afin de permettre une tolérance mutuelle (Howard and Blomquist 2005). L'intégration du parasite social dans la colonie hôte peut se faire par « **camouflage chimique** ». Le parasite acquiert l'odeur en provenance de l'environnement et des membres de la colonie par toilettage, ou bien, il synthétise l'odeur de l'hôte. Des allomones peuvent également être utilisées afin de repousser les hôtes ou de réduire les agressions (Akino 2008). Effectivement, ces allomones de propagande et d'apaisement peuvent perturber le système de reconnaissance contre les parasites, et modifier la réaction des hôtes en les dissuadant d'attaquer. Enfin, le concept d'« **insignifiance chimique cuticulaire** » précédemment expliqué, pourrait être utilisé par les parasites sociaux, afin de paraître indétectable par les hôtes (Lenoir et al. 1999; Lorenzi and D'Ettorre 2020). Cela leur permettrait donc une fois au sein de la colonie, d'acquérir l'odeur coloniale en provenance du nid et des hôtes.

D. Les facteurs qui modulent la signature chimique

a. *Les facteurs intrinsèques*

Les CHCs possèdent une **plasticité phénotypique** et le profil cuticulaire peut donc être modifié par différents facteurs intrinsèques.

De nombreuses études suggèrent que l'**hormone juvénile** (JH) serait impliquée dans la régulation de la communication chimique, et plus précisément que cette hormone jouerait un rôle sur la voie de biosynthèse des phéromones (Tillman et al. 1999). La JH est notamment connue pour avoir à la fois des impacts physiologiques et développementaux chez les insectes

(Goodman and Cusson 2012; Hartfelder and Emlen 2012; Jindra et al. 2013). Différentes formes de JHs ont été décrites, mais la JH-III est l'homologue prédominant (Kotaki et al. 2012). Produites par les corps allates[5], les JHs sont des sesquiterpénoïdes[6] (Goodman and Cusson 2012). Pour la première fois, Lengyel et al. ont montré que la JH-III influencait les signaux de reconnaissance chez un Hyménoptère eusocial. Dans cette étude, l'application de la JH III ou d'un analogue chimique de la JH (méthoprène) chez les ouvrières *Myrmicaria eumenoides*, induisait un changement du profil cuticulaire (Lengyel et al. 2007). De la même manière, après l'exposition à un analogue chimique de la JH, les ouvriers du termite *Reticulitermes flavipes* se sont différenciés en soldats avec une modification du profil en CHCs avant la mue (Darrouzet et al. 2014).

Enfin, en plus des hormones, le **microbiote** pourrait aussi avoir un impact sur la signature chimique des insectes sociaux. C'est le cas chez les fourmis *Acromyrmex echinatior*, où l'altération du microbiote intestinal affecte la reconnaissance des individus en modifiant les profils en CHCs (Teseo et al. 2019).

b. *Les facteurs extrinsèques*

Chez de nombreuses espèces d'insectes, les paramètres environnementaux se sont avérés être des facteurs qui pouvaient modifier la perméabilité de la cuticule, et *in fine* la signature chimique des individus. De nombreuses études ont révélé que les profils cuticulaires pouvaient être modifiés en réponse à des changements de **température** et d'**humidité** (Gibbs and Mousseau 1994; Howard et al. 1995). Chez les termites *Cryptotermes brevis*, il a été démontré que l'augmentation de la température affectait la composition en n-alcanes des nymphes, où l'abondance en n-C29 augmentait et celle en n-C25 diminuait. De la même manière, l'humidité relative a modifié la proportion de certains alcanes et alcènes (Woodrow et

[5]Une paire de glandes neurosécrétrices en position rétro-cérébrale.
[6]Les sesquiterpénoïdes constituent le groupe de terpénoïdes le plus diversifié structurellement et correspondent à des dérivés de trois unités isoprènes.

al. 2000). La **saisonnalité** s'est aussi avérée être responsable de variations des CHCs, comme c'est le cas chez les fourmis *Formica truncorum*, indiquant à nouveau que les paramètres environnementaux pouvaient influencer la composition de la signature chimique (Nielsen et al. 1999).

Également, parmi les facteurs externes, le **régime alimentaire** des individus peut aussi intervenir. La composition du régime alimentaire est, en effet, connue pour avoir de nombreux effets physiologiques sur la santé, la durée de vie et la capacité des individus à se reproduire (Geister et al. 2008; Roeder and Behmer 2014; Dhinaut et al. 2017). C'est pourquoi, le régime alimentaire des insectes pourrait donc aussi possiblement modifier les systèmes de communication et plus particulièrement la signature chimique des individus. Il a ainsi été démontré chez la fourmi d'Argentine *Linepithema humile* que les signaux de reconnaissance pouvaient être modifiés par les hydrocarbures acquis en provenance des proies, et donc qu'il y avait un impact du régime alimentaire sur leur signature chimique (Liang and Silverman 2000; Silverman and Liang 2001).

La capacité des insectes à vivre dans différentes niches écologiques a été mise en évidence ces dernières années. Les espèces invasives en sont l'exemple le plus probant au vu de leur capacité à s'adapter et à s'établir dans différents contextes environnementaux. Pareillement, les insectes étant particulièrement soumis à l'impact des changements climatiques, ces dernières années, appréhender leur potentiel de survie et mettre en place des moyens de conservation se sont révélés être une priorité. C'est pourquoi, connaître l'impact des facteurs environnementaux sur les systèmes de communication des insectes et plus particulièrement sur les signaux de reconnaissance médiés par les CHCs est un enjeu majeur.

IV. **La phéromone d'alarme chez les insectes eusociaux**

A. Médiateurs

Décrite pour la première fois chez un insecte eusocial (la fourmi), en 1934 par Goetsh, la phéromone d'alarme est considérée comme l'une des contributions majeures à la survie et la protection de la colonie (Goetsch 1934). En effet, afin de réduire le risque de prédation, cette substance chimique est synthétisée, puis relâchée dans l'air afin d'être perçue par les congénères. Cette phéromone d'alarme est particulièrement bénéfique à la vie de groupe, car elle permet de communiquer rapidement et donc d'engendrer des réponses collectives appropriées face à différents stimuli. Une substance peut être considérée comme un signal d'alarme lorsqu'elle répond à trois critères. La phéromone doit être libérée en cas d'**exposition à un danger**, elle doit être **perçue par les congénères** et enfin, elle doit induire chez les receveurs, des **réponses comportementales** similaires à celles induites lorsqu'ils sont exposés directement au danger (Wyatt 2003a; Verheggen et al. 2010). Les réponses comportementales peuvent varier suivant la concentration du mélange phéromonal ainsi qu'en fonction de l'expérience de l'individu (Howse et al. 2013). De plus, la composition de la phéromone d'alarme peut être différente suivant la colonie ou la tâche de l'individu (Bradshaw et al., 1979; Hughes et al., 2001).

Chez les insectes, la phéromone d'alarme peut toutefois avoir différentes fonctions (Basu et al. 2021). Chez la plupart des fourmis, l'émission de ces substances chimiques provoque un comportement d'agressivité chez les ouvrières conspécifiques (Hölldobler and Wilson 1990). Mais cette phéromone peut en fait avoir deux fonctions chez les fourmis. Elle peut être considérée comme un **signal d'alarme** lorsqu'elle enclenche des comportements de défense, ou bien elle peut aussi être considérée comme un **signal de panique** afin de favoriser la dispersion des individus en cas de menace (Wilson and Regnier 1971). Il a été démontré que la taille et le nombre d'individus dans une colonie pouvaient être corrélés à la réponse

comportementale déclenchée. Les fourmis vivant dans de grandes colonies, vont aller vers la source d'alarme, comme c'est le cas chez *Lasius fuliginosus* (Stoeffler et al. 2007), contrairement aux petites colonies qui fuient la source d'alarme, comme chez les espèces *Hypoponera opacior* et *Ponera pennsylvanica* (Duffield et al. 1976). Chez les abeilles mellifères, la phéromone d'alarme est relâchée par l'aiguillon et induit le recrutement de congénères afin de défendre la ruche (Boch and Shearer 1966; Wager and Breed 2000). Cette phéromone peut également être utilisée par les abeilles afin de marquer une ressource alimentaire. En effet, chez ces dernières, la phéromone d'alarme n'est pas spécifique à l'espèce et elle peut donc être perçue par le genre *Apis* (Wang and Tan 2019). Cela permet aux abeilles de marquer les ressources florales butinées et ainsi de limiter la compétition entre les espèces. C'est le cas chez *Apis mellifera*, où le 2-heptanone peut être utilisé sur les fleurs comme un **signal de marquage**, afin de repousser les autres abeilles butineuses (Vallet et al. 1991; Giurfa 1993). Ce marquage floral permet aussi de prévenir les autres individus butineurs conspécifiques et hétérospécifiques de la présence de prédateurs, et donc de les repousser d'un éventuel danger (Schorkopf et al. 2009; Li et al. 2014).

La fonction de la phéromone d'alarme dépendrait de sa volatilité, comme cela a été démontré chez les fourmis (Bradshaw et al. 1975). Les composés de cette phéromone sont connus pour leur **grande volatilité** et peuvent donc être perçus sur de longues distances. Très **peu spécifiques**, ces substances chimiques, très **diversifiées** peuvent être des terpénoïdes, des aldéhydes, des alcools, des cétones, des esters, des hétérocycles azotés ou des composés soufrés. La plupart du temps, les molécules ont une structure simple, courte, avec un faible poids moléculaire afin d'avoir un potentiel de volatilité plus élevé (Basu et al. 2021). Les signaux chimiques se dissipent ainsi très rapidement et fonctionnent alors sur de courtes périodes. Le manque de spécificité de cette phéromone peut être considéré comme un avantage pour les espèces qui peuvent percevoir ce signal et qui partagent la même vulnérabilité face à la menace.

La phéromone d'alarme peut être composée d'une simple molécule, ou bien d'un mélange de molécules chimiques complexes. L'action d'une phéromone d'alarme est alors déterminée par sa composition, la proportion des différents composés, sa concentration, ainsi que par la stéréoisomérie des principaux composés (Wadhams 1990).

B. La voie de biosynthèse

Chez les insectes eusociaux, les phéromones peuvent être stockées dans une **glande réservoir** et utilisées comme une source chimique afin d'enclencher des comportements sociaux spécifiques (Blum 1969). Suivant les espèces, la phéromone d'alarme peut être stockée dans diverses glandes (Basu et al. 2021). Chez les fourmis, les sources principales sont la **glande de Dufour** ou la **glande à poison** pour la grande majorité d'entre elles (Fujiwara-Tsujii et al. 2006; Lenz et al. 2013), mais cette phéromone peut aussi provenir des **mandibules** (Blum 1969). Cependant, chez de nombreuses espèces d'insectes, la **glande à venin** est considérée comme la source principale de la phéromone d'alarme (Fortunato et al. 2004; Wang et al. 2016; Cheng et al. 2017), où le signal d'alarme est émis en même temps que le venin (Jeanne 1981).

Comme expliqué précédemment, la phéromone d'alarme peut être composée de diverses molécules chimiques. Chez les insectes sociaux, la biosynthèse de ces composés est relativement peu documentée dans la littérature. Chez la guêpe sociale, *Polybia paulista*, il a été suggéré que la glande de Dufour serait le site de biosynthèse de la phéromone d'alarme, du fait de sa spécialisation dans le **métabolisme des acides gras** incluant des élongations, des insaturations, des estérifications, des réductions et des décarboxylations. De plus, la localisation proche entre la glande de Dufour et la glande à venin, ainsi que la présence de nombreux composés dans les deux glandes, suggèrent qu'après avoir été produits dans la glande de Dufour, les composés chimiques seraient sécrétés puis mélangés au venin dans le réservoir à venin (Esteves et al. 2017). Chez les abeilles du genre *Apis*, il a également été suggéré que la

biosynthèse des esters et de l'eicosénol, se produirait également dans la glande de Dufour via la voie de biosynthèse des acides gras (Martin and Jones 2004).

C. Les facteurs qui modulent la phéromone d'alarme

a. *Les facteurs intrinsèques*

Chez les insectes eusociaux, peu d'études ont analysé l'effet de facteurs intrinsèques sur la composition de la phéromone d'alarme. Cependant, chez *Apis mellifera*, il a été démontré que l'application de méthoprène, un analogue chimique de la **JH,** induit la production prématurée de deux molécules de la phéromone d'alarme, le 2-heptanone et l'isopentyl acetate (Robinson 1985). Également, la production de JH a un impact sur l'agressivité des abeilles, où plus le taux de JH dans l'hémolymphe (taux circulant) est élevé, plus les comportements d'agressivité sont élevés (Robinson 1987). Ces résultats confirment donc que la JH pourrait moduler la composition de la phéromone d'alarme ainsi que les comportements de défense. Enfin, d'autres facteurs non caractérisés pourraient jouer un rôle sur cette phéromone.

b. *Les facteurs extrinsèques*

La phéromone d'alarme est impliquée dans un système de communication clé nécessaire au maintien et à la survie coloniale. L'impact des facteurs environnementaux et plus particulièrement l'impact du changement climatique sur l'organisation sociale de ces insectes est donc un facteur important. C'est pourquoi, la biosynthèse, l'émission, la propagation et la détection des signaux chimiques pourraient être impactés par les **conditions environnementales** (Boullis et al. 2016). En effet, la biosynthèse de la phéromone d'alarme est médiée par différentes enzymes. Étant donné que les insectes sont ectothermes et poïkilothermes, le changement de leur **température corporelle** lié à des températures environnementales changeantes, pourrait alors influencer les activités enzymatiques, et *in fine*, impacter qualitativement et/ou quantitativement la production des molécules constituant la

phéromone, mais aussi modifier la perception du signal d'alarme en impactant l'affinité de liaison entre une molécule chimique et sa protéine de liaison (récepteur antennaire). Cela a été démontré chez *Apis cerana*, où l'augmentation de la température diminuait ainsi les capacités de liaison de ces récepteurs (Weng et al. 2015). La **température de l'environnement** agit également sur la volatilité des molécules (McFrederick et al. 2009). Il se pourrait donc que des changements de températures modifient le bouquet olfactif de la phéromone d'alarme, par une modification de la volatilité de chaque composé, et que l'efficacité du signal en soit par conséquent impacté. Après libération dans l'air, les signaux chimiques volatiles pourraient aussi être impactés par l'augmentation de certains **gaz à effets de serre**. En effet, les terpènes insaturés peuvent être décomposés par l'ozone (Arndt 1995). Il est donc probable que chez les insectes, d'autres composés chimiques soient altérés de la même manière par des modifications de la composition de l'atmosphère, notamment de l'ozone.

Problématique de thèse



©Paul Clemencon

I. Le modèle biologique

A. Biologie du frelon

Le frelon à pattes jaunes, *Vespa velutina nigrithorax*, appelé plus communément frelon asiatique, est un insecte social de l'ordre des **Hyménoptères**.

a. *Morphologie des castes*

Chez le frelon à pattes jaunes, il y a un **dimorphisme sexuel**. Les mâles se distinguent clairement des femelles grâce à un abdomen concave, 2 tâches jaunes au niveau des sternites, une absence d'aiguillon, et 13 segments antennaires. Les femelles ont quant à elles un aiguillon et 12 segments antennaires.

Les femelles *V. velutina nigrithorax* se divisent en deux castes comprenant des **ouvrières stériles**, et des **femelles reproductrices**. Au sein de ces reproductrices, on distingue les gynes, les fondatrices et les reines. Les **gynes** sont considérées comme des femelles capables de se reproduire, elles correspondent aux futures fondatrices avant l'hivernation. Les **fondatrices** correspondent aux gynes qui ont survécu à l'hivernation et qui vont construire un nid primaire. Enfin, les femelles sont considérées comme des **reines** lorsqu'elles ont pondu et qu'une première génération d'ouvrière a éclos.

Morphologiquement, les femelles peuvent se distinguer les unes des autres, mais de manière plus subtile. Les reines sont la plupart du temps plus grosses que les autres femelles. Elles ont les ailes très abîmées, peu voire pas de poils ainsi qu'une bande de couleur jaune orangé sur l'abdomen en position dorsale. Les ouvrières se distinguent des gynes grâce à leur corpulence. En effet, elles doivent accumuler davantage de réserves énergétiques. Elles sont donc plus grosses que les ouvrières et ont un poids compris entre 624 et 721 mg à la fin de l'automne alors que les ouvrières ont un poids compris entre 188 et 386 mg (Rome et al. 2015). Également, pour différencier ces deux types de femelles, l'écartement alaire appelé « mesoscutum » entre

les deux tégulas, peut être pris en compte. Les ouvrières ont un écartement alaire inférieur à 4,5 mm alors que les gynes ont un écartement alaire supérieur à 4,5 mm (Pérez-de-Heredia et al. 2017).

b. *Cycle de vie*

Les frelons vivent au sein d'une colonie, composée d'une reine, d'ouvrières, et pendant la période de reproduction, de gynes et de mâles. Les colonies ont un cycle de vie **saisonnier** (*Figure 8*). Au début du printemps, les fondatrices vont sortir de l'hivernation. Certaines vont construire un **nid embryon**, aussi appelé **nid primaire** ou **nid de fondation**, composé d'une première série d'alvéoles où elles vont pondre des œufs qui deviendront de futures ouvrières. Une fois que les **premières ouvrières** ont émergé vers la fin du printemps, la reine diminue progressivement ses activités hors du nid pour se consacrer exclusivement à la ponte. Les ouvrières vont alors prendre le relais de la reine, et vont se charger d'**agrandir** et de **défendre** la colonie ainsi que d'**alimenter le couvain et la reine**. Pendant l'été, la taille du nid augmente de plus en plus avec le nombre d'ouvrières, jusqu'à atteindre un nombre maximum d'individus en automne. En septembre, la reine va pondre des œufs afin de donner des **individus sexués** correspondant à des **gynes** et des **mâles** (Monceau et al. 2014; Rome et al. 2015). Cependant, il s'est avéré que des mâles diploïdes pouvaient être produits avant l'automne dans la population invasive française (Darrouzet et al. 2015b). Pendant l'automne, les individus sexués vont s'accoupler. Les gynes vont ensuite aller se cacher pour passer l'hiver à l'abri, et commencer au printemps suivant un nouveau cycle. Les ouvrières, les mâles et la reine vont quant à eux mourir pendant l'hiver. Il a été démontré que les plus grandes colonies pouvaient produire plus de 13 000 individus au cours d'une saison (sur l'année), et qu'elles pouvaient contenir à l'automne près de 2 000 ouvrières, 500 futures fondatrices et autant de mâles (Monceau et al. 2014; Rome et al. 2015).

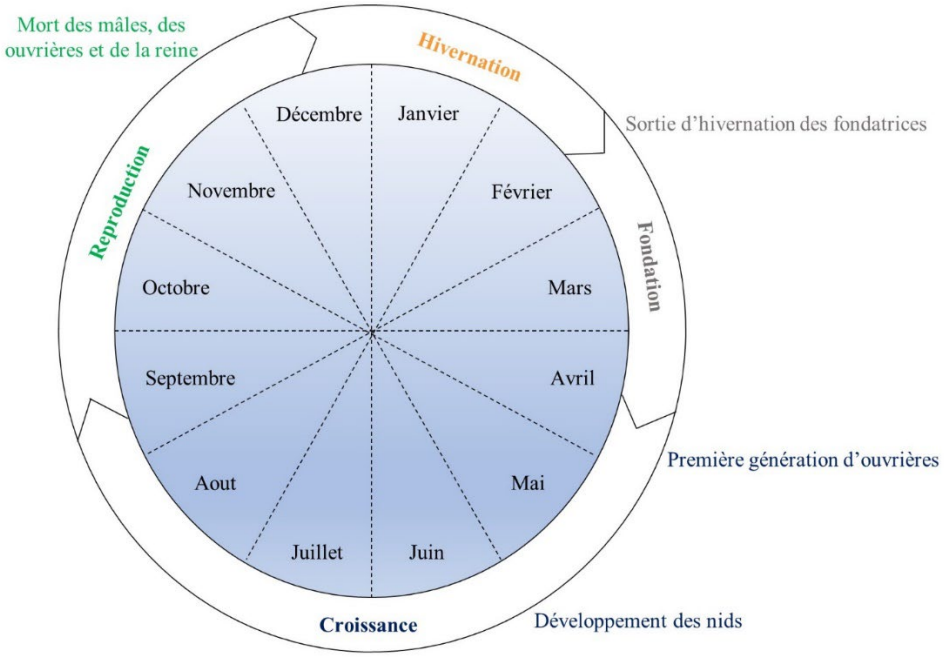


Figure 8. Cycle de vie de *Vespa velutina nigrithorax*. Figure adaptée de Monceau et al., 2014.

c. *Comportement des ouvrières*

Chez le frelon à pattes jaunes, trois comportements majeurs ont été identifiés chez les ouvrières et correspondent à l'**entretien** de la colonie, sa **défense,** ou à la **recherche de nourriture** (Monceau et al. 2017).

Concernant l'entretien du nid, les ouvrières agrandissent le nid en ajoutant des couches de fibres végétales. Elles peuvent également refroidir le nid, en déposant de l'eau sur ce dernier, puis en l'évaporant à l'aide de leurs ailes (Perrard et al. 2009). Les nids sont construits à l'aide de fibres végétales que les frelons récoltent, puis qu'ils malaxent avec de la salive pour les transformer en pâte (Edwards 1980). Ils étalent alors cette pâte en couches successives afin de former des structures appelées galettes contenant des cellules hexagonales ouvertes vers le bas, au sein desquelles la reine pond ses œufs, et les larves s'y développent. Les galettes sont reliées entre elles par des piliers rigides ; le tout entouré d'une enveloppe protectrice de papier mâché, favorable à la conservation de la chaleur. La partie haute du nid est constituée d'une structure spongieuse et solide appelée coiffe, assurant probablement une protection contre les intempéries (Rome et al. 2015; Darrouzet 2019).

L'alimentation des frelons est riche en glucides et en protéines. Le frelon à pattes jaunes est un charognard et un prédateur généraliste d'insectes (abeilles, mouches, guêpes sociales par exemple). Les ouvrières vont donc capturer en vol des insectes, les tuer, ne garder que le thorax riche en protéines et le réduire en une boulette qu'elles ramèneront au nid afin de nourrir par trophallaxie les larves. Lorsqu'une ouvrière se présente face à une larve pour s'alimenter, la larve sécrète en retour un liquide riche en nutriments dont l'ouvrière se nourrit (Matsuura and Yamane 1990; Rome et al. 2011, 2021). Les Vespidae, dont *V. velutina nigrithorax*, peuvent aussi consommer toutes les sources de sucres disponibles dans l'environnement telles que le nectar de fleur, la sève, du miellat ou de la pulpe de fruit (Richter 2000).

Enfin concernant la défense de la colonie par les ouvrières, il a été démontré qu'avec l'âge, la défense ainsi que des comportements agressifs envers les mâles augmentaient (Monceau et al. 2013).

B. Une invasion fulgurante

a. *Aire de répartition naturelle*

Le genre *Vespa* comprend **22 espèces** réparties sur le continent Asiatique, à l'exception de deux espèces, *Vespa crabro* qui se répartit jusqu'en Europe de l'Ouest et *Vespa orientalis* qui se retrouve aussi au nord de l'Afrique. L'aire de répartition naturelle de *Vespa velutina* s'étend de l'Afghanistan à la moitié sud de la Chine (Taiwan inclus), et du nord de l'Inde à la péninsule indochinoise, la Malaisie et l'archipel indonésien. La sous espèce *V. velutina nigrithorax* vit quant à elle au nord de l'**Inde**, à l'est du **Népal**, au **Bhoutan** et en **Chine** (Carpenter and Kojima 1997; Rome et al. 2011).

b. *Histoire de son invasion*

Le frelon à pattes jaunes *V. velutina nigrithorax* a été accidentellement introduit dans le sud de la **France**, vers **2004** (Haxaire et al. 2006). L'analyse des séquences d'ADN

microsatellites de la population invasive française et des populations naturelles d'Asie a révélé qu'**une reine fécondée** par plusieurs mâles et originaire de l'est de la Chine, serait à l'origine de la population invasive. Cette reine, qui était probablement en dormance dans une poterie transportée par voie maritime en provenance de Shanghai, serait issue d'une population native située entre les provinces de **Jiangsu** et **Zhejiang**, en **Chine.** Elle serait arrivée dans le Lot-et-Garonne, où elle se serait ensuite réveillée pour créer une colonie (Arca et al. 2015). Cette espèce s'est ensuite rapidement propagée et s'est établie à travers la France métropolitaine (Robinet et al. 2017) et l'Europe (Robinet et al. 2018). Elle est dorénavant présente sur une grande partie de l'**Europe de l'Ouest** (Lioy et al. 2022) (*Figure 9*) incluant l'Espagne (López et al. 2011; Goldarazena et al. 2015), le Portugal (Grosso-silva and Maia 2012), l'Italie (Demichelis et al. 2014; Porporato et al. 2014), l'Allemagne (Witt 2015), la Belgique (Rome et al. 2013), les Pays-Bas, le Luxembourg (Ries et al. 2021), la Hongrie (Márta and Vas 2023) mais aussi le **Royaume-Uni** (Budge et al. 2017; Franklin et al. 2017; Keeling et al. 2017), la **Suisse**, ainsi que très récemment les **Etats-Unis** (Delaplane et al. 2023).

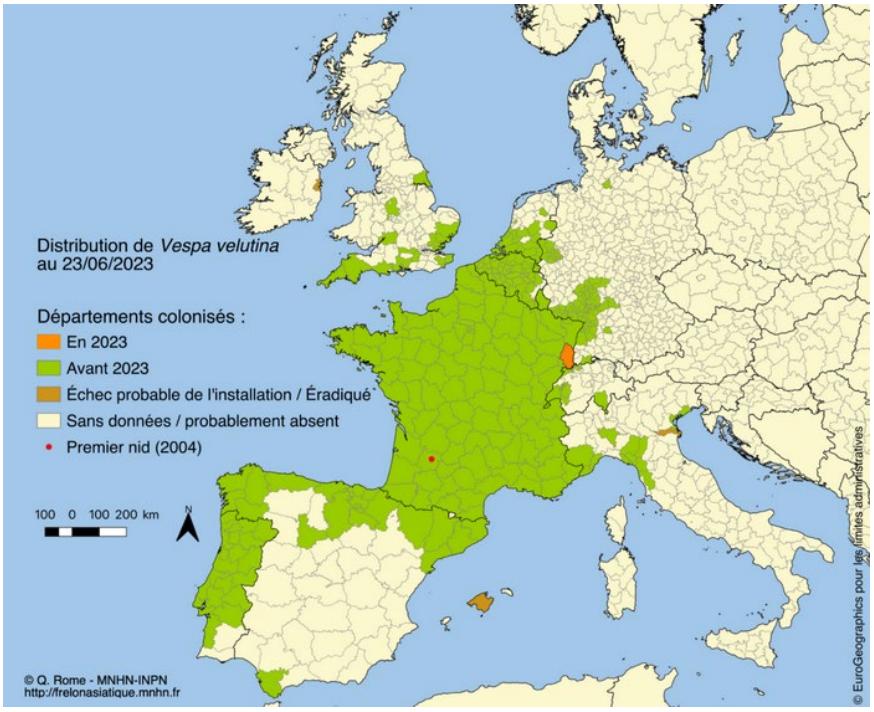


Figure 9. Distribution européenne de *Vespa velutina nigrithorax* en 2023, d'après les données INPN. Source : ©Museum National d'Histoire Naturelle – Quentin Rome

c. *Les impacts de l'invasion*

À la suite de son invasion, le frelon à pattes jaunes a rapidement causé de nombreux impacts négatifs sur la biodiversité. En effet, les colonies de frelons sont très populeuses, ce qui implique qu'une grande quantité de nourriture est nécessaire au maintien de la colonie, et donc qu'un grand nombre d'individus se chargent de cet approvisionnement. Ce **prédateur généraliste** d'insectes chasse toutes sortes de proies et impacte donc l'entomofaune. L'analyse des boulettes protéinées a révélé la présence de nombreux insectes, dont des abeilles et des Diptères impliqués dans la pollinisation (Rome et al. 2011, 2021). Cette espèce de frelon est également très connue pour son appétence pour les Apidés, dont l'abeille domestique, qui constitue 30 à 40% de ses captures (Villemant et al. 2011a). Malheureusement, l'abeille Européenne *Apis mellifera* est très vulnérable face à son attaque, contrairement à l'abeille *Apis cerana* qu'on trouve dans son aire de répartition naturelle et qui a quant à elle développé des systèmes de défense efficaces tels que le « heat ball » et le « shimmering ». Le « heat ball » est un moyen de défense réalisé par les ouvrières qui consiste à former une boule de chaleur (jusqu'à 47°C) autour du frelon afin d'atteindre sa température létale (Ken et al. 2005). Le « shimmering » consiste à impressionner le prédateur en agitant de manière synchronisée leur abdomen afin de réaliser des motifs visuels (Tan et al. 2010, 2012, 2013). Cette appétence pour l'abeille domestique et l'absence de défense chez cette dernière induit donc des **pertes économiques** importantes dans le domaine apicole (Requier et al. 2018, 2019, 2023; Laurino et al. 2019; Leza et al. 2019). Des pertes économiques ont également été recensées dans les vignobles et sur les marchés, à cause de son comportement opportuniste (Darrouzet 2019). Également, des impacts sur la pollinisation ont été constatés (Rojas-Nossa and Calviño-Cancela 2020; Rojas-Nossa et al. 2023). Cette espèce de frelon possède peu de prédateurs sur le sol Européen, à l'exception du guêpier d'Europe *Merops apiaster* (Onofre et al. 2023) et de la bondrée apivore *Pernis apivorus* (Rebollo et al. 2023), ce qui favorise donc son expansion.

Toutefois, la présence de parasites et de virus (Darrouzet et al. 2015a; Villemant et al. 2015; Dalmon et al. 2019; Mazzei et al. 2019; Yang et al. 2019) pourrait l'impacter. Enfin, il cause également des **problèmes de santé publique**, en induisant chaque année, des décès chez les personnes allergiques au venin d'Hyménoptère, et en provoquant des lésions oculaires (Beggs et al. 2011; Laborde-Castérot et al. 2021).

C. Un système de communication chimique hétérogène

Cette espèce sociale et invasive est dotée d'un mode de communication très performant. Comme de nombreux Vespidés, les frelons distinguent les membres issus de leur colonie des intrus, grâce aux CHCs. L'étude de la signature chimique de *V. velutina nigrithorax* a mis en évidence malgré un phénomène de dépression de consanguinité observé dans la population française (Darrouzet et al. 2015b), une **hétérogénéité chimique** en fonction de la **caste**, du **genre** et de la **colonie** (Gévar et al. 2017). Dans cette étude, 75 composés chimiques ont été identifiés et analysés, dont quatre alcènes[7] spécifiques aux reines. Les reines possédaient quantitativement plus de CHCs par gramme d'individu pour leur signature chimique totale, mais aussi pour leur composition en alcènes, alcanes et alcanes mono méthylés, mettant en évidence l'importance de leur signal chimique. Également, une hétérogénéité coloniale pour toutes les castes[8], a été observée. Par la suite, l'hétérogénéité de la signature chimique des castes a de nouveau été confirmée par l'analyse des têtes de *V. velutina nigrithorax* au sein de la population invasive espagnole (Rodríguez-Flores et al. 2021a). Ces deux études ont mis en évidence, des différences intrinsèques entre les ouvrières et les reines. L'hétérogénéité chimique observée dans ces deux études représente un résultat inattendu. En effet, afin d'augmenter leur potentiel invasif, la plupart des espèces invasives tolèrent peu de variations en CHCs et possèdent une homogénéité chimique ; on peut parler de super-colonies (Brandt et

[7] C27:1, C31:1, C33:1 et C35:1
[8]Incluant les reines, mâles, gynes et ouvrières pour chaque colonie

al. 2009; Perdereau et al. 2010, 2011). Effectivement, la comparaison des populations natives et introduites chez la fourmi d'Argentine *Linepithema humile* suggère que la perte de diversité génétique[9] diminue le taux d'agression entre ces dernières et serait responsable par conséquent de l'unicolionalité (Tsutsui et al. 2001). Enfin, cette **hétérogénéité chimique** a aussi été retrouvée **au sein des nids** de *V. velutina nigrithorax* (Haouzi et al. 2021) (*Annexe*). Les différentes structures[10] du nid révèlent la présence de 27 hydrocarbures correspondant à ceux présents sur la cuticule des frelons. Une hétérogénéité chimique structurelle mais aussi coloniale a été mise en évidence dans cette étude. Ces résultats suggèrent que les individus pourraient marquer activement et/ou passivement la colonie afin de se repérer. Le nid pourrait aussi être utilisé dans l'acquisition de l'odeur coloniale chez cette espèce.

Chez le genre *Vespa*, la phéromone d'alarme a également été étudiée, notamment dans le but de développer des pièges phéromonaux. La première étude menée chez l'espèce native *Vespa velutina auraria*, une autre sous espèce de *V. velutina* en Chine, a permis d'identifier les composés de la **phéromone d'alarme** issus de la **glande à venin** (Cheng et al. 2017). Dans cette étude, 16 composés ont été analysés (exclusivement des cétones) dont quatre[11] qui ont provoqué une activité antennaire chez des ouvrières, et trois[12] des comportements agressifs. L'analyse de la glande à venin a ensuite été réalisée chez l'espèce invasive française *V. velutina nigrithorax,* et sept[13] composés chimiques ont à nouveau été retrouvés parmi les 16 analysés dans l'étude précédente (Thiéry et al. 2018). Dans les deux études, des comportements d'attaque ont été observés chez les colonies qui se sentaient menacées, lorsqu'on leur présentait des composés issus de la glande à venin (Cheng et al. 2017; Thiéry et al. 2018). Par la suite, deux autres études sur l'espèce invasive ont analysé la composition de la phéromone d'alarme entre

[9]Suite à un faible taux d'introduction
[10]Galettes, piliers, enveloppes
[11]Non-8-en-2-one, heptan-2-one, nonan-2-one et undecan-2-one
[12]Heptan-2-one, nonan-2-one et undecan-2-one
[13]Nonan-2-one, 4, 8-dimethylnon-7-en-2-one, heptan-2-one, non-8-en-2-one, undecan-2-one et deux composés inconnus

les castes et en fonction du statut reproducteur, ce qui a permis d'identifier de nouveaux composés (Cappa et al. 2019; Rodríguez-Flores et al. 2021b). L'étude de Cappa et al, en 2019, a étudié la composition phéromonale échantillonnée en HS-SPME de la glande à venin, chez des ouvrières et des gynes issues de la population invasive italienne. Au cours de cette étude, huit composés chimiques connus ont été retrouvés et quatre[14] nouveaux composés correspondant à des acétates d'alcools ont été découverts. Les résultats de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence de différences entre les castes. Également, les composés issus de glandes à venin d'ouvrières et de gynes ont été testés sur le comportement des mâles et ne se sont pas révélés attractifs pour ces derniers. Enfin, la dernière étude analysait la composition *in vivo* de la phéromone d'alarme grâce à un dispositif en HS-SPME, ainsi que la composition *in vitro* issue de l'aiguillon, chez des ouvrières et reines provenant de la population invasive espagnole (Rodríguez-Flores et al. 2021b). Des aldéhydes, alcanes méthylés, alcènes, cétones, terpènes, acides gras et esters d'acides gras ont été retrouvés. Seuls trois[15] composés précédemment identifiés ont été détectés parmi les 15 analysés dans cette étude. De plus, suivant les méthodes d'extractions, et entre les castes, des différences qualitatives ont été retrouvées.

L'ensemble de ces études a donc permis d'identifier de nombreux composés présents dans le venin malgré des différences dans les techniques d'extraction, d'analyse et d'échantillonnage.

Enfin, afin d'acquérir davantage de connaissances sur les potentielles odeurs attractives chez cette espèce, et d'envisager des méthodes de piégeage, la **phéromone sexuelle** a aussi été étudiée. Des composés chimiques issus des glandes sternales de gynes vierges se sont avérés attractifs pour les mâles, et ont donc été considérés comme des phéromones sexuelles (Wen et al. 2017b). Ensuite, la composition chimique des différentes castes femelles a été analysée. Malgré des différences chimiques observées entre les gynes et les ouvrières concernant la

[14]Citronellyl acetate, geranyl acetate et deux composés inconnus
[15]2-nonanone, 2-undecanone et 4, 8-dimethylnon-7-en-2-one

phéromone sexuelle, les mâles étaient attirés de la même manière envers ces phéromones (Cappa et al. 2019). Enfin, une analyse comparative entre la population native et introduite en Europe a été réalisée. L'étude a montré une même composition du mélange phéromonal chez les populations natives chinoises de *V. velutina. auraria* et *V. velutina nigrithorax*, et de la population invasive française. Des mélanges des molécules ont été testés en Chine pour déterminer le meilleur mélange afin d'attirer des mâles. Ce mélange a ensuite été testé en France et son caractère attractif pour les mâles des deux pays a été démontré (Cheng et al. 2022).

II. **Le sujet de thèse**

Le succès écologique des insectes eusociaux peut être expliqué par une importante coopération entre les castes, une division du travail élaborée et un potentiel invasif très élevé. Ces dernières années, l'augmentation des échanges commerciaux ainsi que le réchauffement climatique ont engendré le déplacement de nombreuses populations d'insectes (Ascunce et al. 2011; Bertelsmeier et al. 2015). Parmi elles, le frelon à pattes jaunes *V. velutina nigrithorax*, s'est avéré avoir un potentiel et un succès invasif fulgurant en Europe. Il a donc induit de nombreux impacts négatifs à la fois sur la biodiversité (Rome et al. 2011, 2021), l'économie (Requier et al. 2018, 2019, 2023; Laurino et al. 2019; Leza et al. 2019) et la santé publique (Beggs et al. 2011; Laborde-Castérot et al. 2021). Son succès écologique et invasif s'est probablement bâti en partie grâce à un système de communication extrêmement performant. Parmi les différents modes de communication existants, la communication chimique est le principal mode employé par les insectes, et représente une composante majeure dans l'organisation coloniale des insectes eusociaux, mais également dans la protection et la survie de la colonie. Au sein de la population introduite, un phénomène de dépression de consanguinité a été observé (Darrouzet et al. 2015b). Ce phénomène probablement dû à un faible taux d'introduction (1 reine) (Arca et al. 2015) provoquerait donc un goulot d'étranglement

génétique de la population en zone envahie, et devrait *in fine* entraîner une chute de la population. Cependant, ces dernières années, la population invasive ne cesse de s'accroître et de s'établir dans de nombreux pays Européens (Robinet et al. 2018). Malgré l'absence d'homogénéité chimique au sein des populations invasives de *V. velutina nigrithorax*, une hétérogénéité chimique essentielle à la communication coloniale a été observée (Gévar et al. 2017; Rodríguez-Flores et al. 2021a). La connaissance des bases de cette communication chimique pourrait représenter la clé pour comprendre son organisation sociale et contrôler le potentiel invasif de cette espèce.

Cette thèse s'articule donc autour de deux composantes majeures de la communication chimique : **les CHCs** et la **phéromone d'alarme**. En effet, les CHCs sont considérés comme la signature chimique des individus. Ils permettent de protéger les insectes face à la dessiccation, mais surtout de discriminer les individus. Ils peuvent ainsi être impliqués dans l'organisation sociale de la colonie et participer à la régulation des individus pour la division des tâches. La phéromone d'alarme est quant à elle le principal mode de communication utilisé pour la protection de la colonie, et cela en fait donc une composante essentielle dans la survie coloniale. Au cours de cette thèse, différents paramètres essentiels de la communication des frelons ont été étudiés afin de déterminer la différence de composition chimique de ces deux substances sémiochimiques selon les castes. L'acquisition et la dynamique d'évolution en fonction de l'âge et de l'environnement social, ainsi que l'effet d'un apport d'acides gras insaturés ont aussi été analysés (*Figure 10*). Ces différentes études fondamentales avaient pour but de mieux comprendre le système de communication chimique de cette espèce, et ainsi acquérir des connaissances sur son organisation sociale qui en fait un insecte invasif performant.

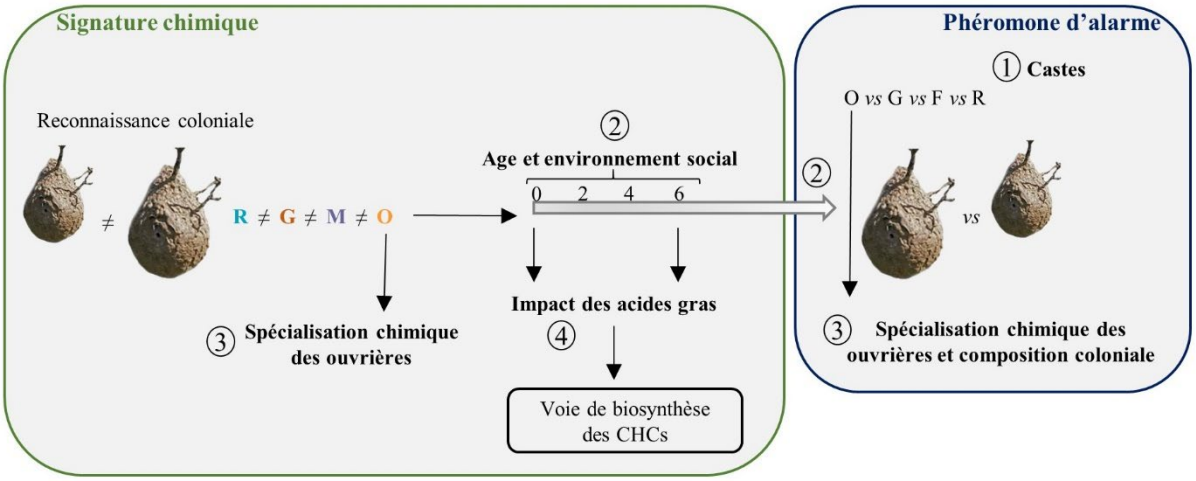


Figure 10. Schéma représentant les différents objectifs de la thèse concernant la signature chimique (CHCs) et la phéromone d'alarme qui seront abordés au cours des différents chapitres. Les chapitres sont représentés par des cercles numérotés. Les principaux résultats actuels connus sont représentés. Les lettres R, F, G, M et O correspondent respectivement aux reines, fondatrices, gynes, mâles et ouvrières. Les différences de couleur chez ces derniers indiquent des différences chimiques.

Au cours de cette thèse, quatre chapitres vont être abordés :

Chapitre 1 : La composition de la phéromone d'alarme dans les différentes castes a été explorée et éclaircie. Pour cela, la composition de la glande à venin chez les ouvrières, les gynes, les fondatrices et les reines a été analysée. Ainsi, de nouveaux composés ont pu être identifiés et le profil chimique pour chaque caste a été établi, ce qui a également permis de mettre en avant des différences qualitatives entre les femelles.

Chapitre 2 : La dynamique de la communication chimique a été analysée. Pour cela, la composition de la phéromone d'alarme issue de la glande à venin ainsi que le profil cuticulaire en CHCs en fonction de l'âge des individus ont été étudiés. Des individus ont été mis en élevage, puis les profils chimiques ont été analysés à différents âges. Cette étude a permis de mettre en avant une acquisition rapide des profils cuticulaires, mais aussi un changement différentiel en fonction de l'âge pour les deux phéromones.

Chapitre 3 : Sur la base des différents comportements observés chez les ouvrières, l'analyse de la signature chimique ainsi que la composition de la phéromone d'alarme ont été étudiées en fonction de l'activité des ouvrières. La division du travail est un phénomène

bien établi chez de nombreuses espèces d'insectes eusociaux. Cette étude permettait donc d'élargir les connaissances actuelles chez le frelon *V. velutina nigrithorax,* concernant la spécialisation des tâches et la communication chimique chez les ouvrières. Également, la composition coloniale de la phéromone d'alarme a été analysée au cours de ce chapitre. Les résultats acquis ont souligné une forte hétérogénéité chimique des ouvrières avec une spécialisation chimique en fonction de leur activité ainsi que des différences chimiques suivant leur origine coloniale.

Chapitre 4 : Enfin, pour déterminer ce qui pouvait influencer l'hétérogénéité chimique observée entre les femelles, selon leurs âges, mais aussi selon leurs activités, l'apport d'acides gras insaturés sur la signature chimique a été étudié. Pour cela, à deux âges distincts, des ouvrières ont été supplémentées en acides gras insaturés, et leur profil chimique a été analysé. Les analyses ont mis en avant un effet différentiel des acides gras sur la voie de biosynthèse des CHCs selon l'âge des individus et la famille chimique des hydrocarbures cuticulaires.

Chapitre 1 : La communication chimique chez les différentes castes



Chapitre 1 : La communication chimique chez les différentes castes

Résumé du chapitre

L'une des caractéristiques majeures des sociétés d'insectes eusociaux est la présence de castes, où les individus peuvent effectuer différentes tâches. La division du travail des reproducteurs sépare les individus fertiles alloués à la reproduction, des individus stériles, souvent grâce à des caractéristiques morphologiques, physiologiques ou comportementales. Parmi ces caractéristiques, les compositions phéromonales peuvent être représentatives des différentes castes, et assignées à des comportements spécifiques. Des études préalables menées sur le frelon à pattes jaunes *V. velutina nigrithorax*, et utilisant différentes techniques d'extraction, ont étudié la composition de la phéromone d'alarme. Ce chapitre vise donc à éclaircir la composition de la phéromone d'alarme produite dans la glande à venin, avec cette fois-ci l'analyse des différentes castes chez les femelles *V. velutina nigrithorax*. Des extractions liquides de glandes à venin chez les ouvrières, gynes pré-hivernantes, fondatrices et reines ont été réalisées. Cette étude a permis de détecter 13 nouveaux composés chimiques dont 9 ont été identifiés parmi les composés précédemment trouvés. De plus, une hétérogénéité chimique en fonction de la caste a été mise en évidence chez les femelles fertiles, soulignant ainsi une évolution chimique du stade de gynes pré-hivernantes au stade de reine. Par la suite, des analyses en SPME ont été réalisées chez des gynes et ouvrières, légèrement ou fortement stressées, afin de déterminer quels composés étaient émis lors d'une exposition face à un danger. Ces analyses ont révélé que l'ensemble des composés identifiés n'étaient pas émis en cas de stress, suggérant ainsi que les composés issus de la glande à venin pouvaient aussi transmettre d'autres types d'informations. Aucune différence d'émission entre les états de stress n'a été identifiée. Ce chapitre nous a donc permis d'éclaircir la composition de la phéromone d'alarme issue de la

glande à venin, et de souligner une dynamique chimique selon le stade du cycle biologique chez les femelles reproductrices.

Chemical profiles of venom glands in queens, foundresses, pre-wintering gynes, and workers in the hornet *Vespa velutina nigrithorax*

Published as: Berville L., Lucas C., Haouzi M., Khalil A., Gévar J., Bagnères, A-G. and Darrouzet E. (2023). Chemical profiles of venom glands in queens, foundresses, pre-wintering gynes, and workers in the hornet *Vespa velutina nigrithorax*. Compte Rendus. Chimie, 26(S2):1-16. 10.5802/crchim.228

Abstract

Invasive species are permanently modifying the distribution and diversity of native species worldwide. For nearly two decades, a hornet, *Vespa velutina nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae), has been spreading in Europe. Due to its marked invasiveness, this Yellow-legged hornet is of great economic and ecological concern, mainly because of the damage it causes to insects in general and bees in particular. Current management methods are sparse and ineffective. Naturally produced by insects, semio-chemicals have been proposed as integrated management tools in this context, either for disruption or mass trapping, as an alternative tool to conventional non-selective traps. Here, we focused on the venom gland, which produces the alarm pheromone. In previous studies, individuals showed marked diversity in their chemical profiles. However, to successfully conduct targeted pheromone-based trapping, the hornet's chemical ecology must be thoroughly characterized. Therefore, it was necessary to better understand the chemical composition of the alarm pheromone of not only workers but also other *V. v. nigrithorax* females. First, we evaluated the differences in venom gland profiles between the four types of females: queens, foundresses, pre-winter gynes, and workers. Next, we experimentally explored the venom gland profiles of *V. v. nigrithorax* workers and pre-wintering gynes by *in vivo* and *in vitro* approaches. We found 13 new compounds in the venom gland, of which 9 were identified (chain lengths: C_8 to C_{12}). Two compounds were found exclusively in reproductive females. Profiles differed among pre-wintering gynes, foundresses, and queens but not between pre-wintering gynes and workers. This result indicates that the

chemical signature of the female venom gland changes over the course of life history: from pre-wintering gynes to foundresses to queens.

Keywords: Yellow-legged hornet, Venom gland, Invasive species, Chemical communication, Vespidae.

Introduction

Invasive species are increasingly affecting the Earth's ecosystems (Seebens et al. 2017). They are permanently modifying the distribution and diversity of native species worldwide (Capinha et al. 2015) at a variety of biological scales and with differing degrees of severity (Lockwood et al. 2013). In many different habitats, social insects are highly successful invaders because of their excellent ability to disperse, compete for resources, mount effective defenses, reproduce at high rates, and exploit a broad range of habitats and diets (Bertelsmeier et al. 2017). Native to China, the invasive Yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax* (Lepeletier de Saint Fargeau 1836), was accidentally introduced into southwestern France around 2004 (Arca et al. 2015). It is a hardy, adaptable species whose flexible dietary requirements have allowed it to invade and establish itself within a variety of habitats (Darrouzet 2019). *Vespa v. nigrithorax* has successfully expanded its range and is now found throughout most of France (Robinet et al. 2017) as well as in several other European countries (Bruneau 2011; Grosso-silva and Maia 2012; Demichelis et al. 2014; Budge et al. 2017; Monceau and Thiéry 2017). Ecosystems invaded by this hornet are impacted in various ways since *V. v. nigrithorax* preys upon several insect and arthropod taxa (Villemant et al. 2011b), including the domestic honey bee, *Apis mellifera* (Requier et al. 2020). Finally, *V. v. nigrithorax* presents human health risks as hornets can aggressively spray liquid in people's eyes (Laborde-Castérot et al. 2021); also, their stings are painful and sometimes even fatal (Vidal et al. 2021; Vidal 2022). Consequently, medical practitioners and researchers are increasingly seeking information on *V. v. nigrithorax* venom for diagnostic and treatment purposes (Vidal et al. 2021;

Popin et al. 2022; Vidal 2022). The hornet's introduction into Europe led to calls for control efforts, which have largely focused on passively trapping adults using homemade or commercial poison baits (Turchi and Derijard 2018). Unfortunately, this approach has done little to limit *V. v. nigrithorax* population sizes (Rome et al. 2011; Turchi and Derijard 2018). Furthermore, because they lack specificity, these traps can have significant ecological impacts on a wide range of non-target species (Rome et al. 2011; Rodríguez-Flores et al. 2019). As a result, work is currently underway (Turchi and Derijard 2018) to develop new species-specific systems that are based on pheromones (Gévar et al. 2017; Wen et al. 2017b; Cappa et al. 2019; Rodríguez-Flores et al. 2021b).

Chemical signals are an essential component of animal communication systems (Wertheim et al. 2005; Yew and Chung 2015) and mediate a variety of behaviors, including social organization. In insects, long-distance signals play an important role in intra- and interspecific communication (Yew and Chung 2015) and elicit species-specific responses. Such communication provides fitness benefits by enhancing colony cohesion, defense, and alarm systems. There is a long history of research on chemical signals (*e.g.*, pheromones) in social insects (*e.g.*, ants, bees, hornets, and termites); these signals often trigger different behaviors (recruitment, dispersal, aggressiveness, or aggregation) that can affect colony survival (Blum 1969; Lucas et al. 2018). Thus, a promising pest control approach is to develop species-specific attractants (*e.g.*, trap bait) or repellents that target specific life stages. Alarm pheromones are of key importance because they are deployed when colonies are threatened: they prompt nestmate recruitment and defense behaviors (Boch and Shearer 1971; Bruschini et al. 2008b). They can also be used by workers to signal danger in areas farther away from the nest (Wang et al. 2016). The most effectively disseminated signals are made up of highly volatile compounds that act quickly and then dissipate, limiting further responses. Most alarm pheromones in social insects are multicompound blends (Bruschini et al. 2010; Wen et al. 2014, 2017b) that are generally

involved in both offensive and defensive reactions by workers. The venom gland tends to be the primary source of alarm pheromones (Ono et al. 2003; Bruschini et al. 2008b), although interspecific variation exists. Thus, during aggressive interactions, alarm signals are released at the same time as venom (Jeanne 1981). Such is the case in several wasp and hornet species, including *Polistes dominulus* (Bruschini et al. 2007), *Vespula squamosa* (Reed and Landolt 2000), *Vespa crabro* (Veith et al. 1984), *Vespa mandarinia* (Ono et al. 2003), and *Vespa simillima xanthoptera* (Ono et al. 2003).

The first study conducted on alarm pheromones in a subspecies of the Yellow-legged hornet characterized the volatile compounds found in worker venom glands in a native *V. velutina auraria* population in China (Cheng et al. 2017). A second study (Thiéry et al. 2018) did the same in an invasive *V. v. nigrithorax* population in France. In both cases, researchers identified some venom gland compounds that elicited hornet attacks when colonies were threatened. When the alarm pheromones were released, they attracted other workers and encouraged stinging behavior. However, compound abundance differed between the two subspecies. Next, researchers explored the chemical signals associated with caste and species' reproductive status using four colonies in an invasive population in Italy; the study looked at compounds in volatile venom gland mixtures in gynes and workers (Cappa et al. 2019). Twelve major compounds were observed, which contrasted with the 16 and 17 compounds observed previously (Refs. (Cheng et al. 2017; Thiéry et al. 2018) respectively). Five of these 12 compounds had been seen in the first two studies. However, others had never been reported before, including 4 unknown acetates of aliphatic alcohols and citronellyl acetate, which had the second highest abundance (Cappa et al. 2019). Finally, work on an invasive population in Spain observed 8 compounds (Rodríguez-Flores et al. 2021b), collected *in vivo* by SPME from seven hornets, including 3 previously seen ketones (Cheng et al. 2017; Thiéry et al. 2018; Cappa et al. 2019). However, in this most recent study, individuals displayed marked diversity in their

chemical profiles since 2 of the 8 compounds were found in only one hornet and 3 others in fewer than 3 hornets (Rodríguez-Flores et al. 2021b); only one compound occurred across all the profiles. There is clearly a need for further research given this range of results. First, a better understanding of the chemical composition of *V. v. nigrithorax*'s alarm pheromone is needed. Second, since gynes, foundresses, and queens alike use alarm pheromones, we also must clarify associations between hornet caste and alarm pheromone composition. However, in the latter three cases, the volatile compounds involved remain poorly characterized. Here, we hypothesized that females from different castes and/or with different tasks might differ in their venom gland profiles.

This study thus had two goals. First, we assessed differences in venom gland profiles among the four types of females: queens, foundresses, pre-wintering gynes, and workers. Second, we experimentally explored venom gland profiles of *V. v. nigrithorax* workers and pre-wintering gynes via an *in vivo* approach (collection of volatiles, solid-phase microextraction (SPME)) and an *in vitro* approach (liquid extraction of compounds from the venom gland).

Materials and methods

Study sites and hornet sampling

Hornet colonies were collected at 44 different sites in the administrative department of Indre-et-Loire, which is part of the Centre-Val-de-Loire region of France (**Fig. 1**). The Yellow-legged hornet is classified as an invasive species, and all research was carried out in compliance with relevant national guidelines. To determine hornet caste (worker versus reproductive), mass and wing spacing were measured (Pérez-de-Heredia et al. 2017). The reproductives were either pre-wintering gynes (females without nest), foundresses (mated females with small nest and some eggs), or queens (mated females with workers). To characterize the venom gland's compounds, hornets of each caste were stored at −80 °C until they could be dissected. For the

second experiment, individuals from a given colony were placed in a mesh breeder box and fed an *ad libitum* mixture of honey and water, which was replenished daily. The hornets underwent SPME within three days of collection.

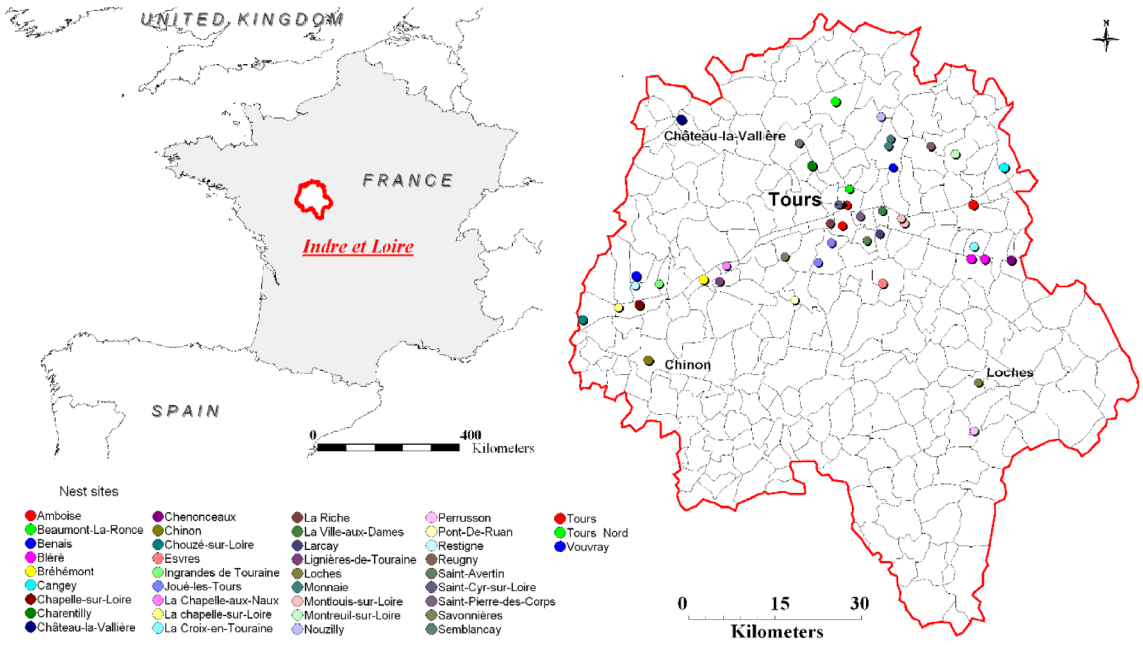


Fig. 1. *Vespa velutina nigrithorax* collection sites.

Analysis of volatile compounds

To characterize the venom gland's compounds, hornets (n = 75 workers, 40 pre-wintering gynes, 30 foundresses, and 30 queens) were dissected under a binocular microscope. Within each group, a set of 5 undamaged venom sacs (n = 15, 8, 6, and 6 replicates for the workers, pre-wintering gynes, foundresses, and queens, respectively) was placed in a vial containing heptane (1 mL). The vials were then stored at −20 °C. Glands were perforated right before performing the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis; the vials were vortexed at 300 rpm for 1 min. Gland extract (2 µL) from each vial were analyzed using a gas chromatograph (Agilent Technologies 7890B) coupled to a mass spectrometer (Agilent Technologies 7000C GC/MS Triple Quad, Les Ulis, France) equipped with an HP-5 capillary column (Agilent Technology, USA; 30 m × 250 µm × 0.25 µm) and using a Gerstel MPS autosampler (electron impact at 70 eV). Helium was the carrier gas (flow rate = 2.3 mL/min).

Injectors were used in splitless mode (splitless time = 2 min) at a constant temperature of 250 °C. The oven temperature was set to ramp up from 50 °C to 200 °C at a rate of 8 °C/min and then from 200 °C to 315 °C at a rate of 5 °C/min (held constant for 5 min). Masses were scanned between 15 and 550 amu at 0.1 scan/s. Immediately before the analysis, 10 µL of internal standard (n-eicosane at 10^{-3} g/mL diluted in heptane) was added to each sample.

To identify and quantify the compounds released by workers or pre-wintering gynes in response to stress, two experimental stimuli were assessed. The experiments were conducted with sets of four live co- workers or four live pre-wintering gynes. The hornets were cold anesthetized (−18 °C for 10 min) and were subsequently placed in a clean 350 mL glass vial at room temperature (19–21 °C for 10 min). The hornets were still able to move but not to fly. Each hornet was exposed once to either a stressed hornet group (SH, replicates: pre-wintering gynes n = 4; workers n = 8) or a wounded hornet group (WH, repli- cates: pre-wintering gynes n = 4; workers n = 8). The SH treatment consisted of gently shaking the hornet group inside the glass vial. The WH treatment consisted of applying pressure to a hornet's thorax using metal forceps; wounded hornets were then released before closing the glass vial. We assumed that the WH treatment induced a higher stress level than the SH treatment. To extract the resulting volatile compounds, a 40-min procedure was carried out using red solid-phase microextraction (SPME) fibers coated with polydimethylsiloxane (PDMS, 100 µm; Supelco). Immediately after the treatments, the fibers were placed within a metal wire to prevent any physical contact with the hornets. First, for each caste, two fibers were desorbed, and the resulting compounds were identified using the temperature program and GC-MS procedure described above. Second, individual fibers representing different castes and treatment groups were desorbed ($WH_{workers}$ n = 8; $SH_{workers}$ n = 8; WH_{gynes} n = 4; SH_{gynes} n = 4) using a GC system (CPG Agilent Technologies 7820A) equipped with a flame-ionization detector (FID) and a capillary column (HP-5 Agilent Technology, Santa Clara, USA; 30 m × 0.32 mm × 0.25 µm); helium served as the carrier gas

(1.7 ml/min). The temperature program was the same as above. The relative area of each compound was calculated based on the proportions represented by each peak within the chromatogram using ChemStation (v. 04.02, Agilent).

Compound identification

The data were analyzed using MassHunter (v. B.07.00; Agilent) and AMDIS (v. 2.0g; NIST, 2011). Compounds were identified based on their mass spectra, which were interpreted via fragmentation analyses (McLafferty F and Turecek F 1993). The results were then compared to published spectra and/or confirmed using commercial standards (**Table 1**) purchased from different suppliers (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA; GreenPharma, Orléans, France; and ChemSpace, Monmouth Junction, New Jersey, USA). The molecules 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one and 4,8-dimethyl-1,7-nonadiene were synthesized by Synthenova (Hérouville-Saint-Clair, France). Kovats retention index (KRI) values were calculated based on the retention times of C_8–C_{20} n-alkane standards (Fluka, 94234) that were analyzed under the same set of GC and GC-MS conditions.

Table 1. Compounds found in venom glands of *V. velutina* subspecies. ❶ Peaks present in both *V. v. auraria* (Cheng et al. 2017) and *V. v. nigrithorax* (Thiéry et al. 2018). Peaks present in *V. v. nigrithorax* populations in ❷ Italy (Cappa et al. 2019) and ❸ Spain (Rodríguez-Flores et al. 2021b). All the compounds observed in this study (**a** to **z**) underwent MS analysis (•) and were identified by comparing their mass spectra with those in the NIST 2017 database (ε) and/or in the literature (✦); final validation was performed using available standards (Δ). The major *m/z* fragments are sorted based on their occurrence frequency (highest to lowest). The Kovats retention index values were calculated and obtained from PubChem and the literature. Chemical Abstracts Service (CAS) of the American Chemical Society. (!) compound (Fig. 3B) identified by Rodríguez-Flores (2021) on the basis of the HS-SPME chromatogram and mentioned as eluting after undecan-2-one. However, its MS spectra, retention time, and KRI value differed from those of the 4,8-dimethyl-1,7-nonadiene standard. * Mass spectra of unknown compound **s** (Fig. 3A) isolated from the venom gland (Fig. 3). n: *Vespa velutina nigrithorax*. *a: Vespa velutina auraria.*

Chemical compound name, identifiers and properties								Compound identifications			
	Molecular				Major fragments	Kovats Retention Index					
ID	name	formula	weight (g/mol)	CAS	(m/z)	from literature	measured	*Vespa velutina* sub-species	in this study methods	id	previous studies
1	Heptan-2-one	$C_7H_{14}O$	114	110-43-0	43,58,71,27	888	-	*a & n*	-	-	❶
2	Heptan-2-ol	$C_7H_{16}O$	116	543-49-7	45,27,43	[877-924]	-	*a & n*	-	-	❶
3	2,6-Heptanedione	$C_7H_{12}O_2$	128	13505-34-5	43,39,82,58	-	-	*a & n*	-	-	❶
4	Acetophenone	C_8H_8O	120	98-86-2	105, 77, 43	[1026-1091]	1032	*a & n*	✦Δε•	**a**	❶
5	8-Nonen-2-one	$C_9H_{16}O$	140	5009-32-5	67, 43, 82	[1042-1055]	1045	*a & n*	✦Δε•	**b**	❶❷
6	Nonan-2-one	$C_9H_{18}O$	142	821-55-6	58, 43, 71	[1046-1094]	1052	*a & n*	✦Δε•	**c**	❶❷❸
7	Nonanal	$C_9H_{18}O$	142	124-19-6	57,41,43,56	1099	-	*n*	-	-	❸
8	Nonan-2-ol	$C_9H_{20}O$	144	628-99-9	69, 55, 56, 57	[1072-1110]	1062	*a & n*	✦Δε•	**d**	❶
9	Isoamyl isovalerate	$C_{10}H_{20}O_2$	172	659-70-1	70, 85, 43, 57	[1080-1110]	1065	*n*	✦Δε•	**e**	-
10	Unknown 1 (cyclohexanol)	$C_{10}H_{20}O$	156	-	43, 71, 95, 138	-	1117	*a & n*	•	**f**	❶?❷?
11	Decanal	$C_{10}H_{20}O$	156	112-31-2	43,41,57,55	1200	-	*n*	-	-	❸
12	Isoamyl senecioate	$C_{10}H_{18}O_2$	170	56922-73-7	83, 100, 55	1146	1145	*n*	✦ε•	**g**	-
(!)	4,8-dimethyl-1,7-nonadiene	$C_{11}H_{20}$	152	62108-28-5	41,69,55,68	1343 ❸	1149	*n*	Δ	-	❸
13	X-C12:1	$C_{12}H_{24}$	-	-	55, 83, 70, 56	-	1152	*n*	•	**h**	-
14	Unknown 2	-	-	-	44, 71, 95, 91	-	1181	*n*	•	**i**	-
15	4,8-dimethyl-7-nonen-2-one	$C_{11}H_{20}O$	168	3664-64-0	95, 110, 85, 69	-	1188	*a & n*	✦Δε•	**j**	❶❷❸
16	2-Nonanyl acetate	$C_{11}H_{22}O_2$	186	14936-66-4	43, 87, 55	[1186-1221]	1195	*n*	✦ε•	**k**	❶?❷?
17	β-Citronellol, methyl ether	$C_{11}H_{22}O$	170	55915-70-3	82, 85, 81, 69	1220	1204	*n*	Δ•	**l**	❶?❷?
18	2-Phenethyl acetate	$C_{10}H_{12}O_2$	164	103-45-7	82, 85, 81, 109	[1221-1279]	1219	*n*	✦ε•	**m**	-
19	X-Undecen-2-one	$C_{11}H_{20}O$	-	-	43, 81, 118, 68	-	1234	*a & n*	•×	**n**	❶
20	X-Undecen-6-one	$C_{11}H_{22}O$	-	-	43, 71, 99, 58	-	1242	*a & n*	•×	**o**	❶
21	X'-Undecen-2-one	$C_{11}H_{20}O$	-	-	44, 69, 97	-	1243	*a & n*	•×	**p**	❶
22	Undecan-2-one	$C_{11}H_{22}O$	170	112-12-9	58, 43, 71, 59	[1247-1342]	1249	*a & n*	✦Δε•	**q**	❶❷❸
23	Undecan-2-ol	$C_{11}H_{24}O$	172	1653-30-1	45,83,55,69	1302	-	*a & n*	Δ	-	❶
24	Citronellyl acetate	$C_{12}H_{22}O_2$	198	150-84-5	81, 95, 69, 123	[1314-1360]	1305	*n*	✦ε•	**r**	❷
25	Unknown 3 *	$C_{11}H_{20}$	-		96, 109, 82, 81	-	1310	*n*	•	**s**	-
26	Geranyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	105-87-3	69, 68, 41, 43	[1340-1409]	1336	*n*	✦ε•	**t**	❷
26 '	Geranyl acetone	$C_{13}H_{22}O$	194	3796-70-1	43,69,41,151	1432	-	*n*	-	-	❸
27	Decane-2,9-dione	$C_{10}H_{18}O_2$	170	16538-91-3	43, 58, 71, 113	-	1339	*n*	✦ε•	**u**	-
28	Unknown 4	-	-		110, 81, 68, 43	-	1370	*n*	•	**v**	-
29	Isopentyl benzoate	$C_{12}H_{16}O_2$	192	94-46-2	105, 70, 123, 55	[1402-1436]	1394	*n*	✦ε•	**w**	-
30	3-Methyl-3-butenyl benzoate	$C_{12}H_{14}O_2$	190	5205-12-9	105, 68, 77	[1412-1421]	1403	*n*	Δ•	**x**	-
31	X-Undecene-2,10-dione	$C_{11}H_{18}O_2$	-	-	43, 81, 124	-	1416	*a & n*	×•	**y**	❶
32	Undecane-2,10-dione	$C_{11}H_{20}O_2$	184	18667-24-8	43, 71, 109, 58	1485	1442	*a & n*	✦Δε•	**z**	❶
33	α-Farnesene	$C_{15}H_{24}$	204	502-61-4	41,93,69,55	1494	-	*n*	-	-	❸

CAS : Chemical Abstracts Service
The major *m/z* fragments are sorted based on their occurrence frequency (highest to lowest).
X: corresponds to the putative position of the double bond for each compound
(!) standard of the molecule suggested by ❸
* Molecule mass spectra of the unknown compound (Fig.3A)

Compound identification methodologies:

✦	Literature and/or published spectra (PubChem)
Δ	Standard
ε	Mass spectral data bases (NIST)
•	Fragmentation analyses

a: Vespa velutina auraria
n: Vespa velutina nigrithorax

Molecules :

a to **z**	in this study, see table 2
❶	in Cheng et al. 2016 and Thierry et al. 2018
❷	in Cappa et al. 2019
❸	in Rodriguez-Flores et al. 2021
❶?❷?	not named in articles, postulated based on profile sighting

Statistical analyses

Venom gland profile composition was analyzed using multivariate principal component analysis (PCA) performed in Statistica (v. 10; Statsoft). The analysis used the percentage representation of identified compounds that occurred above a minimum threshold of 0.5%. The worker and gyne profiles obtained in the stress experiment were explored using another PCA, which employed the percentage representation of all the compounds collected via PDMS-SPME. To assess profile-based grouping patterns, we conducted a K-means cluster analysis (Hartigan and Wong 1979). Because the number of groups is unknown ahead of time, the choice of initial group number is somewhat arbitrary. To optimize this number, we used the Caliñski-Harabasz index (Caliński and Harabasz 1974).

Results

Identification of venom gland compounds

The venom gland profiles contained 38 compounds with chain lengths ranging from 8 to 12 carbons (**Fig. 2**, **Tables 1 and 2**). Of these, 26 occurred at levels higher than the 0.5% threshold (**Table 2**). This group included 11 ketones, 8 esters, 4 alcohols, and 3 unknown molecules. The MS spectrum were investigated, and the identities of the compounds were confirmed using chemical standards (**Table 1**). The unknown compounds were subject to MS interpretation. The third unknown compound (**s**, **Table 2**, **Fig. 3A**) was thought to be 4,8-dimethyl-1,7- nonadiene (**Fig. 3B**, **Table 1**). Indeed, this compound was identified (Rodríguez-Flores et al. 2021b) based on the HS-SPME chromatogram. However, its MS spectra, retention time, and KRI value differed from those of the 4,8- dimethyl-1,7-nonadiene standard (**Fig. 3**). The MS spectra for compound **s** (**Fig. 3A**) and citronellyl acetate (compound **r**) shared some similarities. However, they differed in the presence of a fragment at m/z 152 fragment and a trace of m/z 170. Furthermore, compared to the citronellyl acetate, compound **s** had higher

peaks at m/z 137 (instead of at m/z 138), m/z 96, and m/z 109. Unfortunately, spectra for the citronellyl family remain quite rare, limiting more detailed comparisons. Additionally, we found no other commercial compounds with more similar spectra, thus we were not able to confirm our hypothesis.

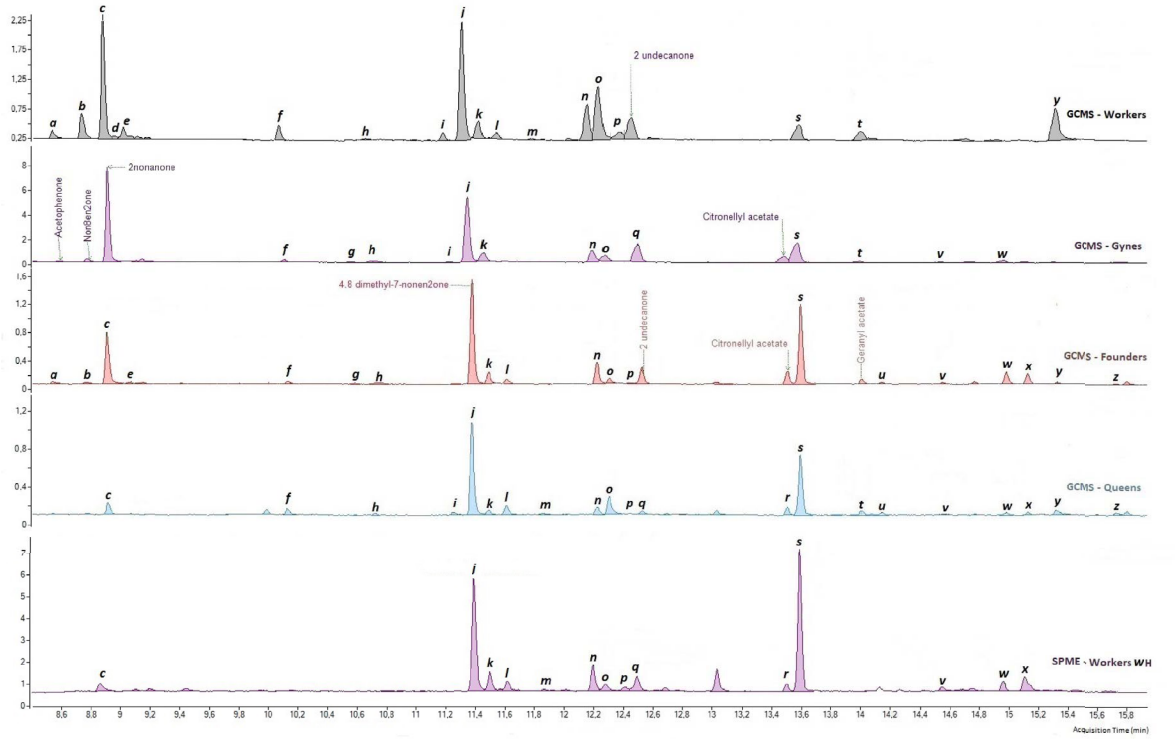


Fig. 2. Chemical profiles of hornet workers, gynes, foundresses, and queens (unit of analysis = pools of five venom glands). The letters refer to the different compounds observed (Table 2).

While the 26 compounds were all present in the pre-wintering gynes and foundresses, 3 were absent from the workers (**g**, **m**, and **w**; **Table 2**), and 1 was absent from the queens (**m**; **Table 2**). In the queens and foundresses, two compounds, 4,8-dimethyl-7- nonen-2-one (**j**) and compound **s**, accounted for more than 58% and 42% of the overall profile, respectively. In the workers and pre-wintering gynes, the two most common compounds were 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one (**j**) and nonan-2-one (**c**); they accounted for 43% and 42% of the overall profile, respectively.

Table 2. Chemical composition of the venom glands of *V. v. nigrithorax* queens, foundresses, workers, and pre-wintering gynes (percentages ± standard error), which were obtained either via solvent- or fiber- based extraction

Name		VENOM GLAND's profile				SPME analysis			
						SH	WH	SH	WH
		Queens	Foundresses	Workers	Prewintering gynes	Workers		Prewintering gynes	
Acetophenone	**a**	1.7 ± 1	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2	$8 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$	-	-	-	-
8-Nonen-2-one	**b**	0.4 ± 0.3	0.8 ± 0.2	3.7 ± 0.9	3.2 ± 0.5	1.1 ± 0.9	1.4 ± 0.4	3.1 ± 2.5	1.1 ± 1.05
Nonan-2-one	**c**	3.4 ± 0.9	16.4 ± 2.8	18.2 ± 3.2	14.2 ± 3.7	7.7 ± 3.8	10.9 ± 3.8	3.3 ± 2.2	6.3 ± 2.6
Nonan-2-ol	**d**	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2	1.6 ± 0.8	0.8 ± 0.9	1.2 ± 0.7	1.5 ± 0.5	1.8 ± 1.1	0.6 ± 0.3
Isoamyl isovalerate	**e**	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.2	2.0 ± 0.9	2.5 ± 0.8	1.2 ± 1.3	0.8 ± 0.5	0.4 ± 0.5	1.2 ± 0.9
Unknown 1 (cyclohexanol)	**f**	3 ± 0.4	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.9	0.8 ± 0.7	-	-	-	-
Isoamyl senecioate	**g**	0.6 ± 0.5	0.2 ± 0.1	0 ± 0	0.1 ± 0.1	-	-	-	-
X-C12:1	**h**	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.9	0.8 ± 1.1	-	-	-	-
Unknown 2	**i**	1.4 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.6	0.5 ± 0.5	-	-	-	-
4,8-dimethyl-7-nonen-2-one	**j**	28.3 ± 5.7	21.8 ± 2.9	23.3 ± 5.3	24.6 ± 3.1	34.4 ± 4.8	38.2 ± 3.1	37.7 ± 7.6	32.5 ± 5.5
2-Nonanyl acetate	**k**	1 ± 0.6	3.7 ± 0.5	3.4 ± 1.1	4 ± 0.8	5.6 ± 1.4	6.7 ± 1.6	6.7 ± 1.2	5.2 ± 1.1
β-Citronellol, methyl ether	**l**	4.5 ± 2.1	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.8	1.7 ± 0.8	4.1 ± 0.6	3.5 ± 1.1	5.7 ± 2.1	3.8 ± 0.8
2-Phenethyl acetate	**m**	0 ± 0	0.4 ± 0.2	0 ± 0	0.2 ± 0.3	-	-	-	-
X-Undecen-2-one	**n**	2.6 ± 0.2	5.5 ± 0.4	9.3 ± 2.9	5.8 ± 1.4	7.1 ± 2.4	7.5 ± 2.8	4.9 ± 1.2	5.7 ± 2.4
X′-Undecen-6-one	**o**	6.7 ± 1.8	2.3 ± 0.7	8.5 ± 2	11.5 ± 2.0	1.3 ± 0.8	0.9 ± 1.3	1.5 ± 1.3	3.5 ± 0.7
X″-Undecen-2-one	**p**	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.1	1.2 ± 0.9	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3	0.3 ± 0.2	1.5 ± 0.4
Undecan-2-one	**q**	2.4 ± 1	6.1 ± 1	7.7 ± 1.6	7.7 ± 2.0	6.9 ± 2.9	8.1 ± 3.1	2.7 ± 0.4	5 ± 1.4
Citronellyl acetate	**r**	1.6 ± 0.8	6.9 ± 2	0.5 ± 0.5	0.7 ± 0.6	5.8 ± 3.8	1.8 ± 1.1	7.9 ± 3.3	11.3 ± 4.9
Unknown 3	**s**	23 ± 5	15.8 ± 2.2	5.2 ± 1.6	7.2 ± 2.6	21.9 ± 6.1	17.3 ± 5.6	23.7 ± 10	22.4 ± 5.9
Geranyl acetate	**t**	1.2 ± 0.5	1.7 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	-	-	-	-
Decan-2,9-dione	**u**	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.8 ± 0.6	0.6 ± 0.4	-	-	-	-
Unknown 4	**v**	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.7	1 ± 0.3	-	-	-	-
Isopentyl benzoate	**w**	1.3 ± 0.1	2.4 ± 1	0.0 ± 0	0.3 ± 0.4	-	-	-	-
3-Methyl-3-butenyl benzoate	**x**	1.2 ± 0.3	2.0 ± 0.8	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.6	-	-	-	-
X-Undecen-2,10-dione	**y**	2 ± 0.6	0.8 ± 0.4	4.5 ± 2.1	4.7 ± 1.8	-	-	-	-
Undecen-2,10-dione	**z**	1.6 ± 0.5	0.5 ± 0.3	1.3 ± 0.8	0.4 ± 0.5	-	-	-	-

Experimental treatments: SH, stressed hornet; WH, wounded hornet.

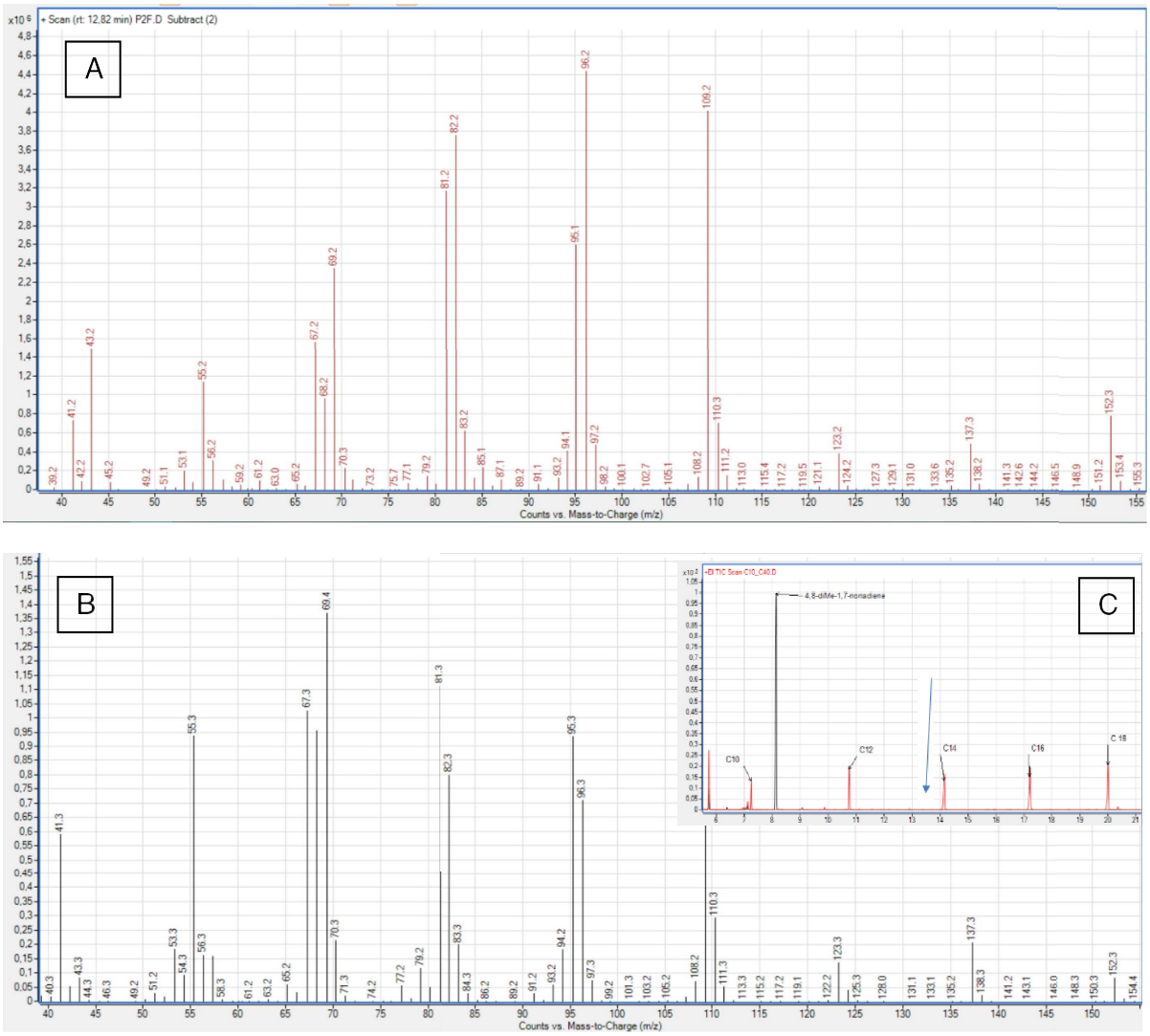


Fig. 3. (**A**) Mass spectra for unknown compound **s** (Kovats retention index = 1310), isolated from the venom gland of *V. v. nigrithorax*. (**B**) Mass spectra for the 4,8-dimethyl-1,7-nonadiene standard (Kovats retention index = 1149). (**C**) Combined GC-MS profiles for C_{10}-C_{18} and 4,8-dimethyl-1,7-nonadiene. The blue arrow represents the molecule **s** location (RT), in the gland profile.

PCAs were carried out on these 26 compounds. Two rounds of analysis were performed. The first explored differences among pre-wintering gynes, foundresses, and queens (n = 7, 6, and 6 pools, respectively, **Fig. 4**). The first and second axes accounted for 40% and 21% of the total variance, respectively, and revealed a marked separation among the three groups. This clustering was confirmed by the K-means analysis, in which the foundresses and queens were assigned to distinct groups. Only one pre-wintering gyne (G2) was incorrectly placed in the queens' group. The queens stood apart from the other two groups based on the presence of three

compounds: acetophenone (**a**) and two unknown compounds (**f** and **s**). The foundresses formed a distinct group based on the presence of four compounds: citronellyl acetate (**r**), geranyl acetate (**t**), isopentyl benzoate (**w**), and isoprenyl benzoate (**x**, *i.e.*, 3-methyl-3-butenyl benzoate). The second round of analysis added profile information for the workers (n = 15 pools) (**Fig. 5**). No differences were seen between workers and pre-wintering gynes, a result confirmed by the K-means analysis resulting in no group separation.

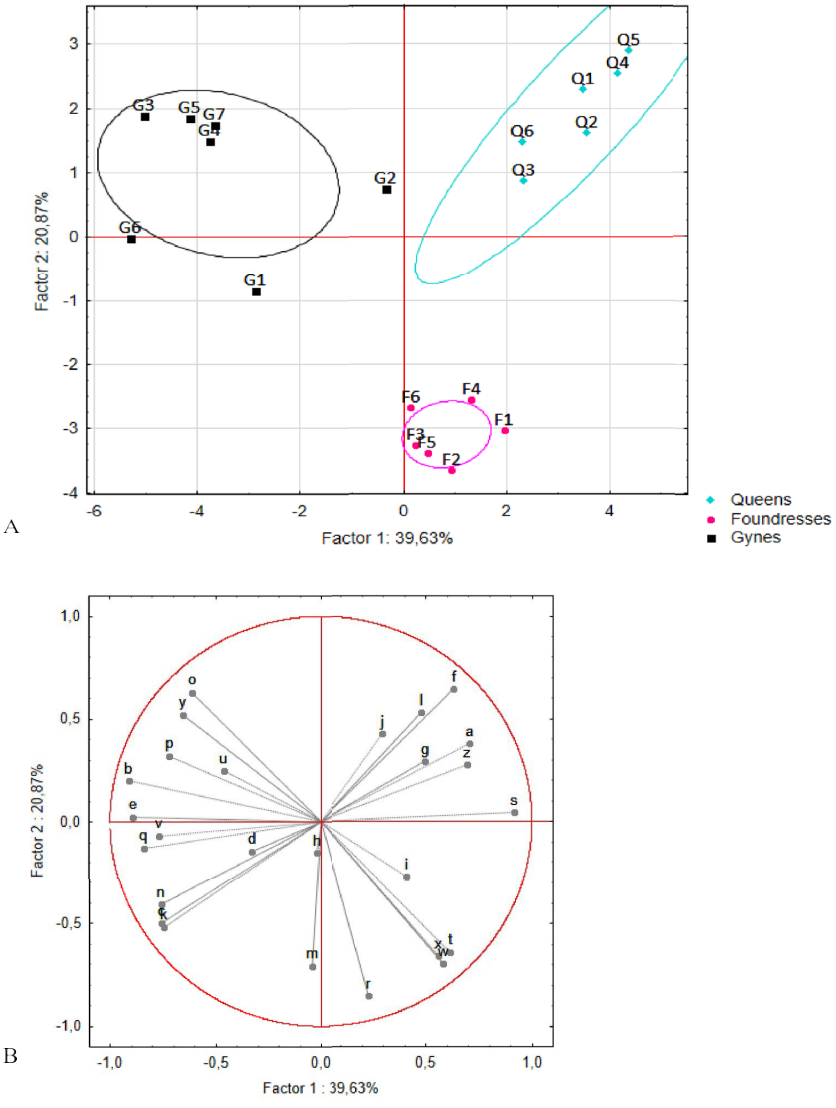


Fig. 4. (**A**) Principal component analysis results and (**B**) correlation circle plot for the venom gland profiles of queens, foundresses, and pre-wintering gynes. Q: queens (n = 6), F: foundresses (n = 6), and G: pre-wintering gynes (n = 7). The ellipses correspond to the 95% confidence interval of the data. Compounds found closer to the circumference of the circle convey greater amounts of information.

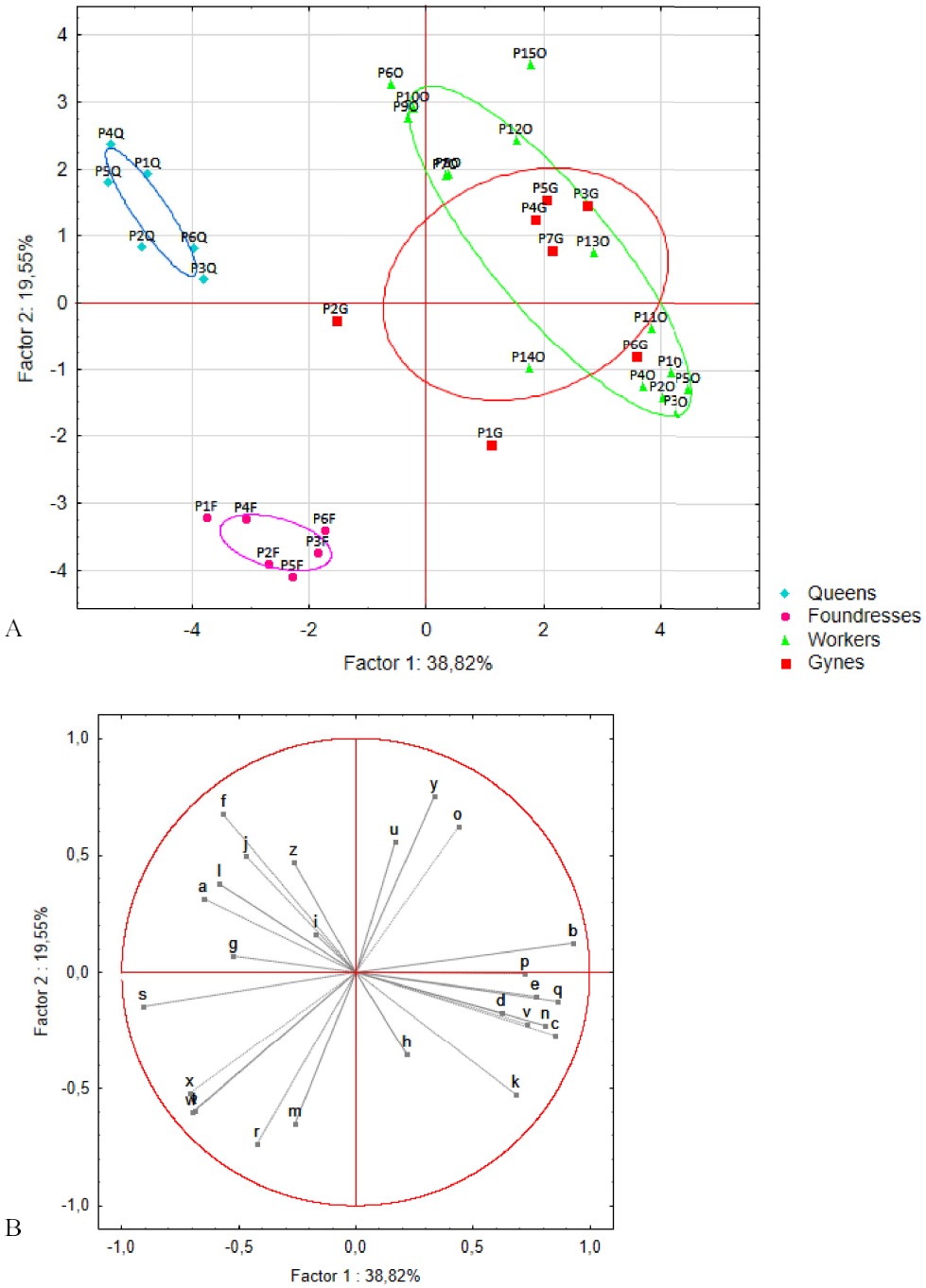


Fig. 5. (**A**) Principal component analysis and (**B**) correlation circle plot for the venom gland profiles of queens, foundresses, workers, and pre-wintering gynes. Q: queens (n = 6), F: foundresses (n = 6), W: workers (n = 15), and G: gynes (n = 7). The ellipses indicate the 95% confidence interval of the data.

The fiber based extractions revealed that the workers and pre-wintering gynes released 13 compounds under stressful conditions (SH and WH). All the compounds were present in the solvent extract obtained from the venom glands (**Table 2**). Two compounds accounted for more than 50% of the total profile: 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one (**j**) and the unknown compound **s**. A

PCA was carried out on the profiles of the workers (n = 16 pools) and pre-wintering gynes (n = 8 pools) subject to the SH and WH treatments. The first and second axes accounted for 42% and 22% of the total variance, respectively. The analysis did not show any clear differences based on caste or treatment (**Fig. 6**).

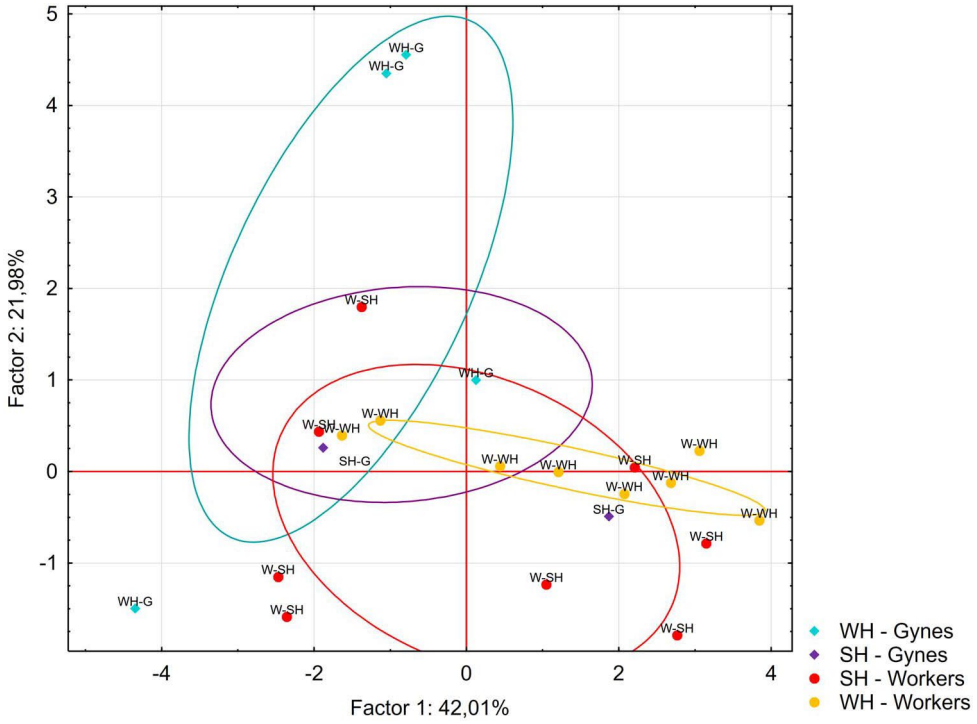


Fig. 6. Principal component analysis of the 13 compounds identified via PDMS-SPME after workers and pre-wintering gynes were experimentally stressed (SH treatment, G: n = 4 and W: n = 8) or wounded (WH treatment, G: n = 4 and W: n = 8). The ellipses indicate the 95% confidence interval of the data.

Discussion

As insects evolved to form organized societies, it became essential for them to develop communication systems for sharing diverse messages (Maynard-Smith and Harper 2003). Eusocial insects most commonly employ chemical communication (Blomquist and Bagnères 2010a), and it can be challenging to study the cues and signal patterns involved in different behaviors (*e.g.*, recruitment, dispersal, aggressiveness, or aggregation) (Blum 1969; Shorey 1973; Bruschini et al. 2010). Chemical signals, like pheromones, can rapidly and efficiently disseminate information and are used by all eusocial insects (Hölldobler and Wilson 1990; Leonhardt et al. 2016). Volatile pheromones are common and may convey information across

great distances (Brossut 1996; Bruschini et al. 2008b; Leonhardt et al. 2016). Previous studies identified 19 compounds with chain lengths ranging between 7 and 12 carbons in workers of both *V. v. auraria* and *V. v. nigrithorax* (Cheng et al. 2017; Thiéry et al. 2018; Cappa et al. 2019; Rodríguez-Flores et al. 2021b). The majority were ketones, the most phylogenetically widespread class of alarm pheromones (Leonhardt et al. 2016). In the study presented here, 9 new compounds were identified among the 13 compounds found, which displayed the same range of chain lengths as in previous research (Table 1). To our knowledge, this is the first time that three of them (β-citronellol methyl ether [**l**], 2-nonanyl acetate [**k**], and 2,9-decanedione [**u**]; Table 2) could been identified as potential semiochemicals or as molecules involved in toxic actions. Other compounds that we observed are known to have communication functions in Hymenoptera. Geranyl acetate (**t**) is used by three *Bombus* species (Kullenberg et al. 1970), and citronellyl acetate (**r**), isoamyl isovalerate (**e**), and isoamyl senecioate (**g**) occur in the European hornet *Vespa crabro* (Wheeler et al. 1983). Undecan-2-one (**q**) occurs in *Dolichovespula maculate* (Jimenez et al. 2016) and *Polistes* species (Bruschini et al. 2007). Nonan-2-one (**c**), 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one (**j**), and undecan-2-one (**q**) are known to elicit different levels of alarm in *Vespa orientalis* (Saslavasky et al. 1973). Thus, these compounds may be common in Vespidae. Some compounds have also been found in other insects. For example, phenethyl acetate (**m**) is an attractant in *Diachasmimorpha longicaudata* (Carrasco et al. 2005) and is part of a pheromone released by the milkweed bug *Neacoryphus bicrucis* (Aldrich et al. 1999). Others, such as isopentyl benzoate (**w**) and isoprenyl benzoate (**x**), are volatiles in plants (Leffingwell and Alford 2005; 2022). The presence of undecan-2-ol, in contrast to previous research in *V. v. auraria* (Wang et al. 2016) and *V. v. nigrithorax* (Saslavasky et al. 1973), was not observed. Since a reference sample of undecan-2-ol was also injected, using the same method, and present in the profile, we are confident that the absence of this compound does not reflect a dehydration or thermolysis artifact in our GC-MS injector.

This same previous research (Cheng et al. 2017; Thiéry et al. 2018) discovered that four compounds were common in the venom glands of *V. velutina* workers: nonan-2-one (**c**), 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one (**j**), X-undecen-2-one (**n**), and undecan-2-one (**q**). In our study, however, the main compound observed in all castes was 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one (21–28%, liquid extraction), not nonan-2-one. Nonan-2-one was the second most common compound in workers, pre- wintering gynes, and foundresses but not in queens (relative representation: 4%). Instead, the second and third most common compounds in queens were compound **s** (23%, **Fig. 3**) and undecen-6-one (**o**), respectively. In Cheng et al. (2017), *Vespa v. auraria* collected did not display the peak for compound **s**. Nevertheless, compound **s** might correspond to the unidentified peak placed after the citronellyl acetate in both *Vespa v. auraria* (seen by (Wen et al. 2017b)) and *V. v. nigrithorax* (seen by (Thiéry et al. 2018)). Additionally, compound quantity differed between our work here and that of Cheng et al. (2017). For example, in *V. v. auraria*, Cheng et al. found that X-undecen-2-one (**n**) and undecan-2-one (**q**) were the second and third most common compounds, respectively; in our study, however, they were present at far lower levels (2.6–9.3%, liquid extraction). In short, our results differ quantitatively and qualitatively from those of both Cheng et al. (2017) and Thiéry et al. (2018).

Considering that undecan-2-ol was absent from our results and that we observed a different set of common compounds (*i.e.*, like citronellyl acetate in the French and Spanish hornet populations), it could be that the hornet's chemical blends are changing at the population scale, as has been seen in some ants (Liang and Silverman 2000; Buczkowski et al. 2005; Blight et al. 2012). Whether such shifts between and within subspecies could arise from isolation by distance or difference in evolutionary lineages is a question that merits further exploration.

In the venom gland profiles, there were clear differences among the gynes, queens, and foundresses. This result indicates that the chemical signature of the female venom gland changes over the course of life history: from pre-wintering gynes (females without nest) to

foundresses (mated females with small nest and some eggs) to queens (mated females with workers). However, no differences between the pre-wintering gynes and workers profiles were observed. This result shows that pre-wintering gynes start off with profiles similar to those of workers but that those profiles then change over time. The most obvious change could be seen in compound **s**: its mean relative levels were 5% in workers versus 7, 15, and 23% in pre-wintering gynes, foundresses, and queens, respectively. Unfortunately, no match was found for compound **s** in any of the available databases. However, this compound did have a fragmentation spectrum highly similar to that of citronellyl acetate (**r**): fragments 137 and 152 were present, and fragment 138 was almost completely absent.

The differences among the females raise questions about the hornet's chemical ecology. The blend observed could act as an alarm pheromone for pre-wintering gynes, which occur in their colony of origin and can play a defensive role alongside workers. However, the queens displayed a different compound ratio, which could mean that the blend had a more queen-specific function. Indeed, this compound ratio could serve as a specific signal from the queen, potentially informing the colony's workers that their queen has a problem or is in danger. Alternatively, it could act as a signal of queen presence and health. Indeed, research on wasps, bees, and ants has shown that reproductives may chemically communicate their fertility (Monnin et al. 2006). Consequently, it could be that compound **s** is a signal generated by mature egg- laying queens. Further study is needed to explore this hypothesis in *V. v. nigrithorax*.

Previous studies identified 12 compounds in the crushed venom glands of workers (*V. v. nigrithorax*; (Thiéry et al. 2018)) and in living hornets (*V. v. auraria*; (Cheng et al. 2017)) using blue PDMS fibers (Supleco). Here, we used SPME and liquid extracts to characterize the compounds released by the venom glands of *V. velutina* hornets as a result of experimental stress or wounding. 13 out of 26 compounds in this study were identified in living hornets using red PDMS fibers (Supleco). We found 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one (32– 38%; **j**) to be the most

common compound, followed by compound **s**. The results were unaffected by either caste (worker versus pre-wintering gyne) or treatment. When stressed, both groups of hornets emitted an alarm signal that was the same as the one emitted when facing a life-threatening event. Eight of the compounds associated with this signal had been previously observed in both *V. v. auraria* and *V. v. nigrithorax* (Cheng et al. 2017; Thiéry et al. 2018). Recent work by Rodriguez-Flores et al. identified 8 compounds in queens (n = 4) and workers (n = 3) using HS-SPME/GC-MS (Yew and Chung 2015; Rodríguez-Flores et al. 2021b). Among them were nonane-2-one, undecan-2-one, and 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one, which have been seen in all studies on the hornet's chemical ecology; in contrast, nonanal, decanal, geranyl acetone, and 4,8-dimethyl-1,7-nonadiene were not seen (Rodríguez-Flores et al. 2021b). The differences between our results and previous research could be explained by SPME fiber type, collection materials, and/or chromatography methods and machine systems.

This study represents an important step towards developing pheromone-based traps. Indeed, the next step is to identify all the components of *V. v. nigrithorax* pheromones, including compound **s**, which might be important in queen signaling. A useful approach could be to assess the effects of each major compound, first individually and then in proportionally accurate blends. Indeed, certain compounds may only elicit a strong response when they occur in blends, as is the case with alarm pheromones in honey bees (Breed et al. 2004) or sex pheromones in moths (Linn et al. 1986). Moreover, the precise compound ratio of blends could be of major importance. It is also essential to test the effects of any target compounds on bees. Given that alarm pheromones are produced during both defensive and offensive situations, they could also serve as a kairomone for the hornet's prey. Indeed, bees may detect certain components of hornet alarm pheromones and modify their behavior accordingly.

Chapitre 2 : Acquisition de la communication chimique en fonction de l'âge et de l'environnement social



Chapitre 2 : Acquisition de la communication chimique en fonction de l'âge et de l'environnement social

Résumé du chapitre

L'organisation sociale des individus se base sur un système de reconnaissance efficace afin de discriminer les congénères des intrus. Parmi les composés sémiochimiques, les CHCs peuvent être employés comme des signaux de reconnaissance inter- et intra-spécifiques. La reconnaissance des conspécifiques se base sur des variations de profils cuticulaires incluant des signaux héréditaires et/ou acquis par l'environnement social. La théorie du « Gestalt model » suggère que tous les membres d'une colonie s'échangent des CHCs afin de maintenir une odeur coloniale uniforme et de ne pas être rejetés par les autres individus de la colonie. C'est pourquoi, l'acquisition de cette odeur est primordiale pour les jeunes individus. Dans ce chapitre, la signature chimique des frelons juste après l'émergence a été analysée au cours du temps et comparée à celles d'individus plus âgés (ouvrières) ainsi qu'aux enveloppes, structures faisant partie du nid. Les résultats ont révélé que les jeunes individus âgés de moins de 24 h possédaient leur propre signature chimique et qu'elle était clairement différente de celles des ouvrières âgées et du nid. De plus, il a été démontré que la signature chimique évoluait rapidement, en moins de 48 h, pour acquérir celle des ouvrières âgées. L'analyse des profils cuticulaires en fonction de l'environnement social, c'est-à-dire en fonction de la présence d'une ouvrière et/ou de matériaux du nid a aussi été étudiée chez les jeunes individus. Juste après l'émergence, les frelons ont donc été placés dans différentes conditions expérimentales pendant 6 jours et leur signature chimique a ensuite été analysée. Les analyses n'ont pas révélé d'acquisition du profil cuticulaire par l'environnement social, suggérant ainsi que des facteurs intrinsèques pouvaient influencer la signature chimique des individus.

La phéromone d'alarme est quant à elle particulièrement utile à la vie de groupe. Elle est utilisée par les insectes lors d'une exposition à un danger, et est donc essentielle à la survie de la colonie

en permettant le recrutement des congénères et la mise en place de mécanismes de défense. Le chapitre précédent démontrait que le signal d'alarme était hétérogène chez les femelles, et plus particulièrement que sa composition évoluait en fonction du stade biologique des femelles fertiles. Cependant, l'impact de l'âge sur cette phéromone est inconnu chez le frelon. C'est pourquoi, dans ce chapitre, l'étude de la composition de la glande à venin chez des individus nouvellement émergés, 6 jours après émergence et au stade adulte (ouvrières âgées) a été analysée *in vitro*. Les résultats révèlent que juste après l'émergence, tous les composés chimiques, à l'exception du cyclohexanol ont été retrouvés sur leurs profils chimiques. La phéromone d'alarme pourrait être utilisée dès l'émergence des individus malgré l'absence de comportements agressifs chez ces derniers. Également, le signal d'alarme des individus âgés de 6 jours était significativement différent de celui des adultes plus âgés. Ces résultats soulignent donc que la composition de la phéromone d'alarme évolue sur plusieurs jours chez les ouvrières. Enfin, des molécules caractéristiques pour chaque groupe d'âge ont été identifiées au cours de cette étude. Cette observation suggère que le signal d'alarme pourrait transmettre des informations différentes en fonction de l'âge des frelons émetteurs.

Globalement, ce chapitre a donc permis de mettre en avant l'importance des signaux de reconnaissance chez le frelon *V. velutina nigrithorax*, et de souligner l'acquisition rapide du profil cuticulaire des individus nouvellement émergés, contrairement à la phéromone d'alarme qui évolue chimiquement sur le plus long terme. Enfin, la phéromone d'alarme pourrait jouer différents rôles dans la communication en fonction de l'âge des individus.

Partie 1 : La signature chimique

Callows have their own odour but not for long: Fast acquisition of the chemical signature in the Yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax*

Published as: Haouzi M*., Cheng Y*., Berville L., Lucas C., Tan K and Darrouzet E. Callows have their own odour but not for long: Fast acquisition of the chemical signature in the yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrothorax*. Entomologia Generalis, 43(6), 1117-1125.

Abstract

In eusocial insects, the discrimination between conspecifics and intruders is essential for the functioning of most insect societies. This capacity mediated by pheromones, and in particular by Cuticular Hydrocarbon Compounds (CHCs) is the main mechanism of social nestmate recognition which can include heritable cues, as well as acquired cues from nestmates and/or their environment. In this study, we analysed the acquisition of the chemical signature of callows over time, compared to nestmate workers and their nest materials in the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax*. We show that callows present their own chemical signature, different from both the oldest individuals and nest materials. Interestingly, this chemical signature evolves rapidly, the first two days after emergence, and is not influenced by the presence of a chemical template (workers and/or nests) in laboratory conditions. Moreover, quantities of branched alkanes increased with age. All these results suggest that the chemical signature in *V. velutina nigrithorax* is probably more influenced by some parameters like physiological processes or genetic factors.

Keywords: Vespidae, cuticular hydrocarbons, nestmate, nest, age, Asian hornet

Introduction

In social insects, the increasing complexity of social organization involves coordinating activities among nestmates in a variety of contexts, which therefore requires a wide diversity of signals (Leonhardt et al. 2016). Chemical signals are the main communication system employed, using pheromones (Abd El-Ghany 2020).

On insect's cuticle, Cuticular Hydrocarbon Compounds (CHCs) are involved in protection against desiccation (Gibbs 2002), but also in many behaviours which include recognition processes. In such processes, CHC profiles are considered to be specific and called chemical signature of insects (Ginzel and Blomquist 2016). This allows insects to convey their identity to their congeners (Blomquist and Bagnères 2010a). Many studies demonstrated that the chemical signature of insects is complex and dynamic, with CHCs varying quantitatively and qualitatively (Blomquist and Ginzel 2021). Depending on the species, CHCs are generally a mixture of saturated (alkanes) and/or unsaturated compounds, which may be methylated or not. These CHC mixtures allow complex profiles with functional significance (Ginzel and Blomquist 2016). CHCs are produced in oenocytes from the fatty acid biosynthesis pathway (Krupp et al. 2008). The Acetyl-coA, a fatty acid precursor, is converted to alcohol and then oxidized to aldehyde. It then undergoes decarboxylation which converts it into hydrocarbons (Kent et al. 2008). Three different pathways can be used in order to obtain linear alkanes, branched alkanes or alkenes, of different lengths (*i.e.*, with different number of carbon atoms). Then, CHCs will circulate into the hemolymph to the cuticle of insects thanks to lipophorins (Lucas et al. 2004; Blomquist and Ginzel 2021). In Vespidae (like several other species), these CHCs can vary according to species and colonies (Soares et al. 2017), but also according to castes and sexes (Gévar et al. 2017). These compounds can thus be employed as contact pheromones with the use of antennae for inter and intra-specific recognition processes (Blomquist and Bagnères 2010a).

New-emerging insects, *i.e.* callows, may have a period of weak chemical signature called "cuticular chemical insignificance", followed by a period of integration where they synthesize and obtain their own CHCs from nestmates and/or nest materials like it has been shown in ants (Lenoir et al. 1999). The Gestalt model suggests that all nestmates share their own recognition cues with colony members to create a colonial identity. This model explain

how insects recognize and discriminate nestmates from intruders (Hefetz 2007). In Hymenoptera, the proportion of CHCs can change rapidly after emergence to acquire the colonial profile (Lorenzi et al. 2004), through trophallaxis and social grooming, as previously demonstrated in ants (Lahav et al. 2001). In the ant *Rhytidoponera confusea*, individuals could acquire colonial odour from nest materials (Crosland 1989). The acquisition of the chemical signature in callows is therefore of crucial importance for their social integration and the maintenance of a stable social organization at the colony level.

The invasive yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax,* was accidentally introduced to southwest France from China in 2004 (Arca et al. 2015). Since, then it has rapidly invaded several countries throughout Europe (Robinet et al. 2018). In the European population, despite the presence of an inbred population (Darrouzet et al. 2015b), the chemical signature of individuals is heterogeneous (Gévar et al. 2017). Studying the dynamics of the chemical signature, and environmental factors that may influence this heterogeneity is crucial to understand the social life and the invasive success of *V. velutina nigrithorax*. Here, we aimed to investigate the chemical signatures of hornet callows, and more particularly the cuticular profiles dynamics according to ages and local environments. Indeed, the local environment, with the presence of conspecifics and/or nest materials, could serve as chemical sources. To test this hypothesis, the chemical signature of callows was analysed over time, then in relation of their local environment, *i.e.,* in the presence of congeners and/or nest materials.

Materials and Methods

Hornets sampling

Three different *V. velutina nigrithorax* colonies were collected in Indre et Loire region (France), in the cities of Bléré, Saint-Épain and Truyes. For each colony, after their collection, workers (W) were isolated in plastic breeding boxes with aeration (L95 x W65 x H65 mm) at

ambient temperature, then fed with honey and water *ad libitum*. Combs were also collected, checked daily, awaiting the emergence of callows at ambient temperature. Each callow (C) was isolated on the day of its emergence and reared in the same manner as adult workers.

Experimental setups

Chemical analyses were performed to study (i) a potential "cuticular insignificance" of callows, (ii) the evolution of their chemical signatures over time, and (iii) the chemical signature acquisition according to their local environment.

Cuticular chemical insignificance of callows

To highlight a "cuticular chemical insignificance" of callows, chemical analyses were performed to compare callows on their day of emergence (less than 24 hours of age: C_0), adult old workers (W, unknown age since these workers were isolated when the colony was collected in the field) and nest material (N). For the nest material, envelopes were chosen for their ease of sampling and because they possess a colonial odour (Haouzi et al. 2021). In this first experiment, 6 technical replicates were performed per colony for each modality (C_0, W, N). Each hornet (n=36) was frozen killed, placed in a vial with 1ml of heptane, and vortexed 1 min head up and 1 min head down. Then, 500 µl of the extract was placed in a new vial (Gévar et al. 2017). Immediately prior to the analyses, 10 µl of n-eicosane at 10^{-3} mg/µl was added, and vortexed for 10 s. For each nest, 150 mg of nest material (N) corresponding to envelopes were ground into small particles, and was placed in a vial with 5 ml of heptane and vortexed for 1 min. The extracts were left to stand for 24 h, allowing the particles to settle. Subsequently, 1.5 ml of the supernatant was transferred into a new vial and completely evaporated under nitrogen flux. Then, 150 µl of heptane was added, and the mixture was vortexed for 30 s. Afterward, a 100 µl aliquot was transferred to a vial (Haouzi et al. 2021). Immediately before analyses, 3 µl of n-eicosane (n-C20) internal standard at 10^{-3} mg/µl were added and vortexed for 10 s.

Evolution of the chemical signatures over time

Just after emergence, callows were isolated in plastic boxes, as described above. To study the evolution of the chemical signature over time, callows were frozen killed at different ages: on the day of emergence (between 0 and 24 h: C_0), two days later (between 48 and 72 h: C_2), four days later (between 96 and 120 h: C_4), six days later (between 144 and 168 h: C_6), or eight days later (between 192 and 216 h: C_8). CHCs from frozen individuals (n=90) were immediately extracted following the same procedure as in the first experiment. For each age modality (C_0, C_2, C_4, C_6, C_8), 6 technical replicates were performed per colony.

Chemical signature acquisition depending on local environment

Environmental conditions of callows were manipulated from the day of emergence (C_0) according to four modalities: a callow was placed alone (C), with an old nestmate worker (CW, condition Callow-Worker), with a piece of 0.5 g of nest material (CN, condition Callow-Nest), or with both a worker nestmate and a piece of 0.5g of nest material (CWN, condition Callow-Worker-Nest). Each callow was frozen on the sixth day of the experiments (6-days-old callows) and CHCs (n=57) were extracted in the same way as previously described. For each modality (C, CW, CN, CWN), five technical replicates were performed per colony, except for Saint-Épain (5 samples C, 3 CW, 4 CN and 5 CWN). For each replicate, workers, callows and nest material were provided from the same nest.

Chemical analyses

In each experiment, 2 µl of each chemical extract were injected in a gas chromatograph (Agilent Technologies 7820A GC) equipped with a Flame Ionization Detector (FID), and a capillary column HP-5 (Agilent Technology 19091J-413, 30 m × 320 µm × 0.25 µm). Helium was the carrier gas at 1.7 ml/min. The temperature program started from 50°C to 200°C at 8°C/min, then 200°C to 315°C at 5°C/min, and a 5-min hold at 315°C.

To identify CHCs, a second series of injections were performed on a gas chromatograph (Agilent Technologies 7890B GC) coupled to a mass spectrometer (Agilent Technologies 7000C GC/MS Triple Quad) using an HP-5 Ultra Inert capillary column (Agilent Technology, USA; 30 m x 250 µm x 0.25 µm) and a Gerstel MPS autosampler. The same temperature program described above was used. Injectors were in splitless mode with a splitless time of 2 min at a constant temperature of 250 °C. Helium was the carrier gas set up at 1.2 ml/min. Electron impacts at 70 eV were recorded in scanning mode every 0.3 s with a scan lapse of 0.1 s and a mass scan range of 40–600 amu. Data were analysed using MassHunter B.07.00 software (Agilent). Compounds were identified according to fragmentation analyses and compared to published spectra (Gévar et al. 2017), and spectrum library AMDIS v2.0g (NIST, 2017). Chromatograms were integrated using the ChemStation B.04.03[16] software (Agilent Technologies).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software (v4.1.0). Technical replicates were pooled and averaged (*i.e.* sample replicates by modalities and by nest). Relative abundances of CHCs were calculated by dividing the area of each compound by the sum of all the CHCs, and the total was multiplied by 100.

Permutational Analysis of Variance (PERMANOVA, n = 999 permutations) were performed to test the effects of the different modalities on the chemical profiles, for the three experiments called (i) a potential "cuticular insignificance" of callows (C_0 *vs* W *vs* N), (ii) the evolution of their chemical signatures over time (C_0 *vs* C_2 *vs* C_4 *vs* C_6 *vs* C_8), and (iii) the chemical signature acquisition according to their local environment (C *vs* CW *vs* CN *vs* CWN). PERMANOVA were executed on the Bray-Curtis dissimilarity matrices calculated with the chemical profile between each pair of samples, using the adonis2 function from the vegan

package (v2.6-2). To illustrate results, Principal Coordinate Analysis (PCoA) were performed using the ape package (v5.6-2).

To further cluster the age of callows (C_0 *vs* C_2 *vs* C_4 *vs* C_6 *vs* C_8) according to their chemical similarities, Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) were performed using mixOmics (v6.16.3) and RVAideMemoire (v.0.9-81-2) packages. Four PLS-DA models were carried out: all age groups (i, C_0, C_2, C_4, C_6, and C_8), four age groups where C_6, and C_8 were clustered (ii, C_0, C_2, C_4, and C_6-C_8), three age groups were C_4, C_6 and C_8 were clustered (iii, C_0, C_2, and C_4-C_6-C_8) and two age groups where C_2, C_4, C_6, and C_8 were clustered (iv, C_0, and C_2-C_4-C_6-C_8). The performance of each model was assessed by a Classification Error Rate (CER) computed using a double cross-validation scheme. Permutation tests (999 permutations) based on the averaged CER were used to conclude the significance of the differences between clusters. Then, pairwise correlation tests based on cross-model validation of models were performed, and *p*-values were corrected using the False Discovery Rate (FDR) method. For each model, we measured a Variable Importance in the Projection (VIP) scores to acknowledge the importance of each variable.

For each sample, the quantity of each CHC was estimated with the following formula: $Q_i = \frac{(Q_{C20} \times X_i)}{(X_{C20})}$ where Q corresponds to the quantity, X to the peak area and C20 to the internal standard. Quantities were divided by the mass of hornets or nest materials to obtain the per-gram quantity of each compound. Quantities were log-transformed to normalize data. To analyse which CHC quantities differ between modalities, in the three above experiments, we performed Linear Mixed Effect Models in R (LMER) with colony factors as random effect using the lmer function (package lme4, v1.1-30). For all these analyses, chromatogram peaks containing a mix of compounds were excluded. Prerequisites of each LMER models were confirmed by the DHARMa package (v0.4.6). Afterwards, ANOVAs using models were carry

out using the car package (v3.1-1), and estimated marginal means were calculated using pairwise comparisons.

Results

The 21 main chromatogram peaks, including compounds ranging from 21 to 31 carbon atoms in chain length (**Table S1, Fig. S1**) with a relative area higher than 1% of the entire profiles, were analysed. It includes chemical compounds with mixtures of chemical families in the same peaks or not, *i.e.* 6 alkanes, 8 alkenes and 10 branched alkanes.

Cuticular chemical insignificance of callows

On the two first axis of the PCoA (**Fig. 1**), 87% of the chemical variability is explained by modalities (C_0 *vs* W *vs* N) with a significant effect (PERMANOVA test, $R^2 = 0.87$; $p = 0.003$).

The quantitative analyses between modalities showed significative differences for alkanes (ANOVA, $p < 0.001$), alkenes ($p < 0.001$) and branched alkanes ($p = < 0.001$). For branched alkanes, callows (C_0) are significantly different from workers (W) ($p < 0.05$, **Table S2**). Callows (C_0) and nest material (N) are significantly different in their alkanes and alkenes quantities ($p < 0.05$, **Table S2**). For both alkenes and branched alkanes quantities, workers (W) are significantly different from nest materials (N) ($p < 0.005$, **Table S2**). Callows (C_0) have fewer branched alkanes than workers (W), but they have more alkanes and alkenes than nest materials (N) (**Table S3**, **Fig. 2**). Workers (W) have more CHCs compared to nest materials (N) for both alkenes and branched alkanes quantities (**Table S3**, **Fig. 2**).

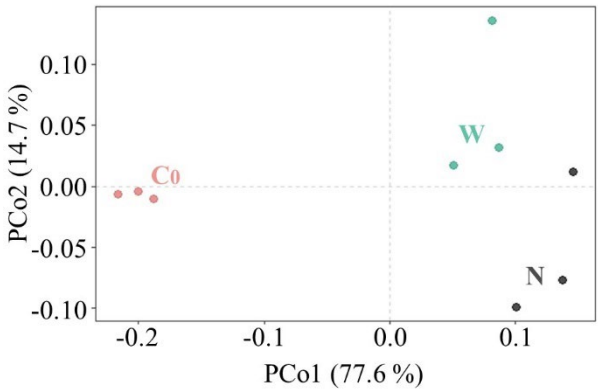


Fig. 1. Plot on the first two axis of the Principal Coordinate Analysis (PCoA) with Bray-Curtis distances. C0 corresponds to callows on their first day of emergence, N: nest materials and W: workers.

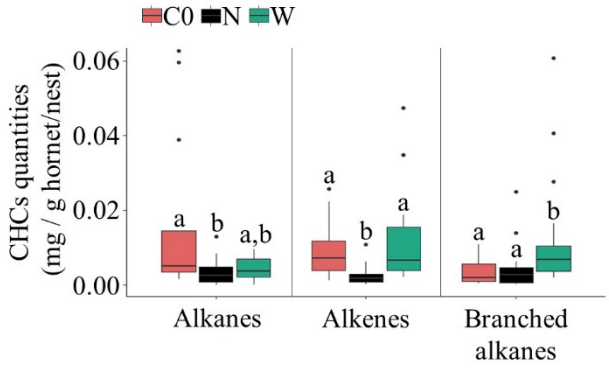


Fig. 2. Boxplots representing quantities of the different chemical compound families according to modalities. C0: callows on their first day [between 0 and 48 hours], N: nest materials and W: workers. Modalities with common letters are not significantly different ($p > 0.05$).

Evolution of the chemical signatures over time

As callows (C_0) are chemically different from older workers, a new analysis was performed on their age (C_0 *vs* C_2 *vs* C_4 *vs* C_6 *vs* C_8), which showed its influence on the chemical profiles (PERMANOVA, $R^2 = 0.77$, $p = 0.001$, **Fig. S2**). For PLS-DA models, the cross-model validations (2CV) gave 54% ± 2.9 SE (i, **Fig. S3 A**), 36% ± 1.5 SE (ii, **Fig. S3 B**), 12.7% ± 1.6 SE (iii, **Fig. 3A**) and 0% ± 0 SE (iv, **Fig. 3B**) of the CER. Differences between sample groups have been highlighted for models with (ii) four age classes (CER = 0.39, $p = 0.005$), (iii) three age classes (CER = 0.13, $p = 0.002$) and (iv) two age classes (CER = 0, $p = 0.003$) contrary to the model (i) with all age classes (CER = 0.63, $p = 0.063$). In the first model (i) and the second model (ii), no differences have been observed between callows (pairwise.MVA.test, $p > 0.05$,

for all comparisons, **Table S4**). However, in the third model (iii) with three age classes, C_0 and C_2 are significantly separated from C_4-C_6-C_8 cluster ($p = 0.021$ and 0.044 respectively) but also in the fourth model (iv) where C_0 is significantly separated from C_2-C_4-C_6-C_8 cluster ($p = 0.005$). VIP scores were measured and indicated in **Table S1**.

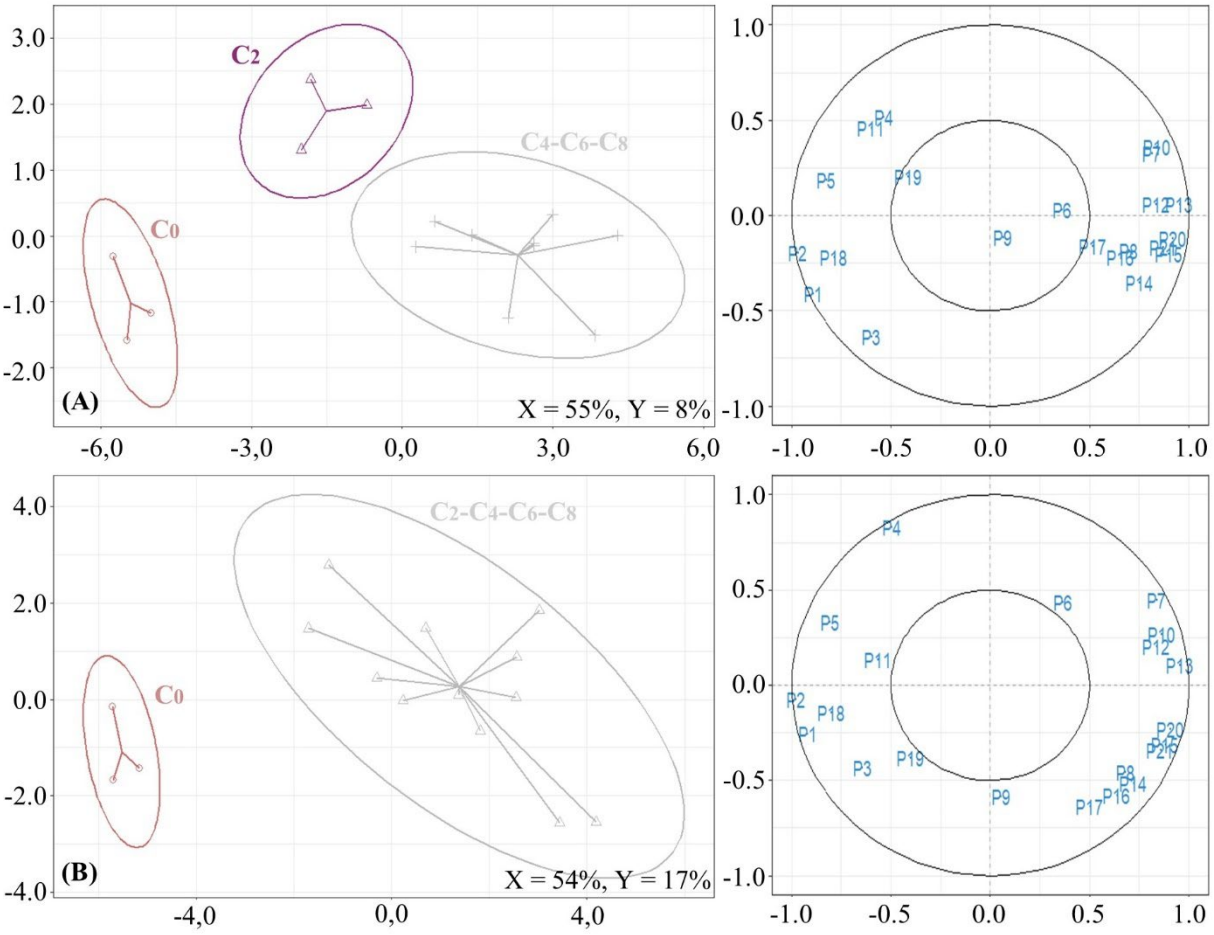


Fig. 3. Score and correlation circle plots on the first two axis from the PLS-DAs based on the chemical composition on different models. Fig (A) corresponds to the third model with three age classes where C4, C6 and C8 were clustered, and Fig (B) corresponds to the fourth model with two age classes where C2, C4, C6 and C8 were clustered. Correlation circle plots allow visualizing the discriminant compounds (Table S1), and how they contribute to each component. Ellipses represent confidence levels set up at 95%.

The quantitative analysis showed significant differences for branched alkanes (ANOVA, $p = 0.002$). Compared in pairs, C_0 is significantly different from C_6 and C_8 (Pairwise tests, $p < 0.05$, **Table S5**). Branched alkanes quantities increase with time (**Fig. 4, Table S5, S6**). No significant differences have been demonstrated for alkanes and alkenes ($p > 0.05$). We

have a large dispersion of data among callows aged from C_0 to C_4. On the Fig. 4, alkanes quantities seem to decrease with the age of callows whereas branched alkanes quantities increase, as demonstrated in the **Table S6**. In the model, which included old workers and C_8 callows for branched alkanes quantities, no significative effect has been observed (ANOVA, $p = 0.156$).

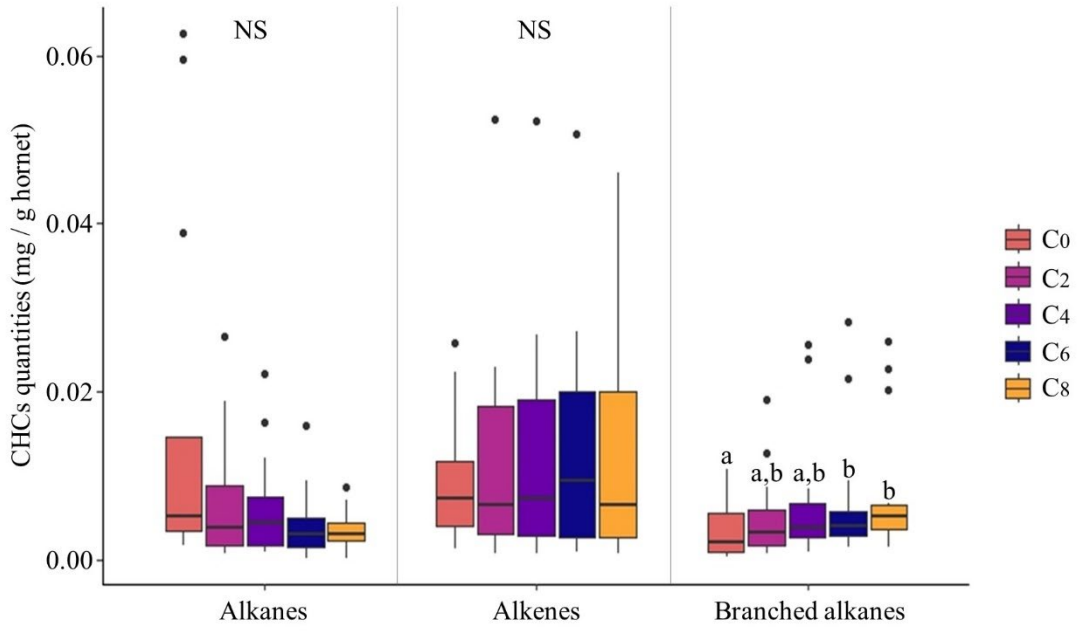


Fig. 4. Boxplots representing chemical compounds families' quantities according to modalities. Callows at different age: C0, C2, C4, C6, and C8. Modalities with common letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Chemical signature acquisition depending on local environment

Callows were placed in different contexts of local environments (C *vs* CW *vs* CN *vs* CWN). As the second experiment showed no differences in cuticular profiles of C_4, C_6, and C_8 callows, the experiment was done up to 6th day.

The local environment conditions were not significantly determinant on callows CHCs (PERMANOVA, $R^2 = 0.21$; $p = 0.083$, **Fig. S4**).

Finally, the quantitative analysis for callows in different local environments showed no significant differences for all chemical families (ANOVA, $p > 0.05$). However, there are non-

significant trends where the amounts of all CHCs increase with the presence of a chemical template (CN, CW, CWN) compared to callows alone (C) (**Fig. 5, Table S7**).

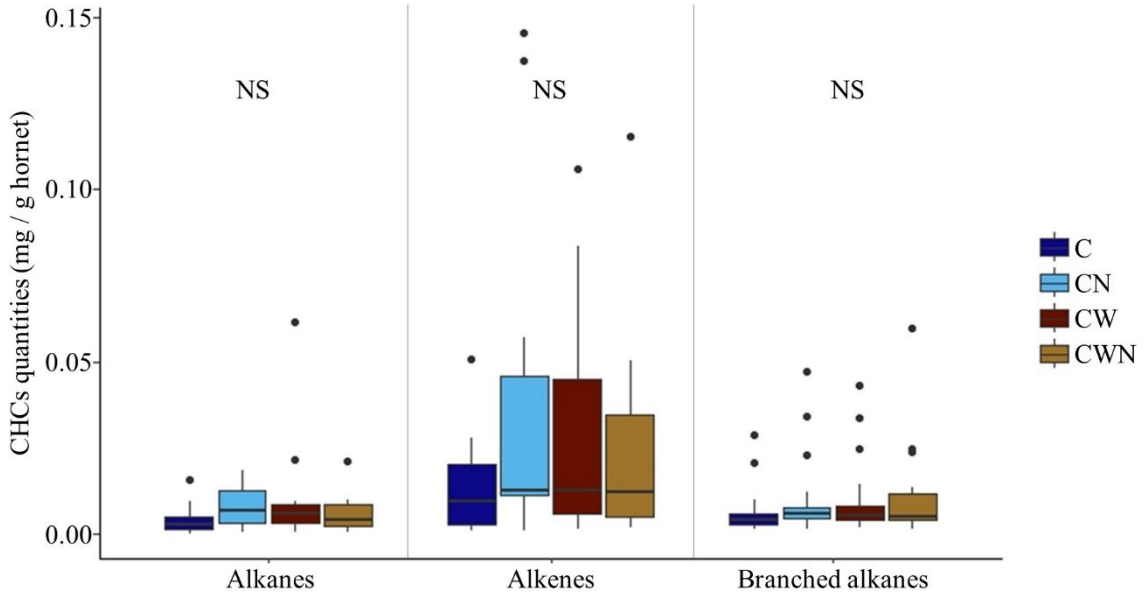


Fig. 5. Boxplots representing chemical compound families' quantities according to modalities. Callows were placed in different conditions: Callow only (C), Callow-Nest (CN), Callow-Worker (CW), and Callow-Worker-Nest (CWN). Modalities with common letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Discussion

Upon emergence, *V. velutina nigrithorax* callows have their own chemical signature, clearly different from those of their nest and adult nestmates. For all chemical compound families, differences have been highlighted between callows, adult workers, and nest materials. For example, quantities of branched alkanes are significantly lower in callows compared to workers. These compounds employed in communication can be used as signals for the colonial chemical identity (Martin et al. 2008a) and nestmate recognition (Lucas et al. 2004; Blomquist and Ginzel 2021). We assume that the colonial signature shared between nestmates requires more time to be obtained. In fact, in *Pachycondyla apicalis* ants, cuticular lipids distribution was homogenized between 5 and 10 days (Soroker et al. 2003). It has been demonstrated in *Polistes dominulus* wasps, that young individuals can absorb hydrocarbons contrary to adults (Lorenzi et al. 2004). This phenomenon could be the same in *V. velutina nigrithorax*. However,

for the most part of CHC quantities, individuals (callows and/or workers) have more compounds than nest materials.

Callows cuticular profiles could be chemically undetectable and considered as "chemical insignificant" (Martin et al. 2008b). Consequently, our results support previous publications in other Hymenoptera (Lenoir et al. 1999; Uboni et al. 2012). Callows possess a weak chemical signature, probably to avoid being rejected by nestmates and to more easily acquire the colonial odour. Indeed, in the ant *Cataglyphis cursor*, newly emerged workers are adopted by an unrelated colony during their first four days and rejected after this date (Nowbahari and Lenoir 1989). In *Myrmica sp.* during the first days of adult life, chemical mimicry was observed by grooming hosts (Lenoir et al. 1997). Moreover, callows of *V. velutina* possess more linear alkanes than branched alkanes, contrary to adult workers which possess more branched alkanes than linear alkanes. The weak chemical signature for callows is probably linked to a weak quantity of compounds and in the same time with this difference in linear alkane and branched alkane composition.

In our study, we observed that the chemical profiles of callows evolve during the first 48 hours after emergence. The chemical signature is dynamic and can depend on the age of the insects, as demonstrated in honey bees (Winston 1987) and the ants *Formica truncorum* (Nielsen et al. 1999). In Vespidae, the cuticular profile changes between 24 and 72 hours after emergence (Panek et al. 2001). In Diptera, the same phenomenon has been observed, where CHC quantities increase during the first four days (Jackson and Bartelt 1986).

The quantities of branched alkanes increase in callows with time (0.003 mg for C_0 compared to 0.007 mg in C_8), as it was observed in *Polistes dominulus* (Lorenzi et al. 2004). No difference has been shown between C_8 callows and old workers, suggesting that their branched alkanes quantities are stable at this age. An important number of branched alkanes may be present in individuals which can leave the nest. In ants, it has been demonstrated that individuals which

stay in the nest had a lower ratio of branched alkanes (Wagner et al. 1998). Therefore, in these species, branched alkanes could be considered as an indicator of the adult stage. It has been suggested that CHC profiles are correlated with both the capability of insects to work outside and their age (Bonavita-Cougourdan et al. 1993).

In different local environments (*i.e.,* in the presence of conspecifics and/or a piece of nest), callows show the same cuticular profiles. It suggests that these epigenetic factors are not responsible for the acquisition of CHCs after emergence. This is true for the 6 days of our experiments, but more time might be necessary to observe further CHC modifications. Moreover, performing a local environment more representative of their social and natural conditions, for example with more hornets or a real nest environment, could be important, and might be tested. However, some other epigenetic factors can also modify the cuticular profiles like gut microbiota (García-Roa et al. 2022) or hormones (Wicker-thomas and Jallon 1995; Holze et al. 2021).

To conclude, our results showed that the chemical signature in *V. velutina nigrithorax* is dynamic. Callows have a weak chemical signature which could be probably characterized as a "cuticular insignificance chemical signature" in early life. This chemical signature evolves rapidly during the first days and is not influenced by the environment (nestmate and/or nest material). We also show that quantities of branched alkanes increase in callows, to reach those corresponding to older workers. Further studies are needed to determine the factors able to modulate CHC profiles at the beginning of adult life, like genetic and/or physiological factors.

Supplementary materials

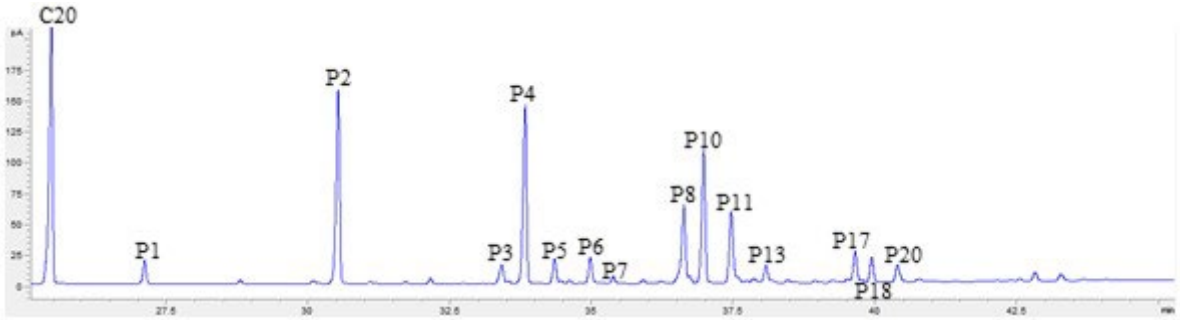


Fig. S1. Chromatogram of a callow C0 (less than 24 hours) with peaks identification.

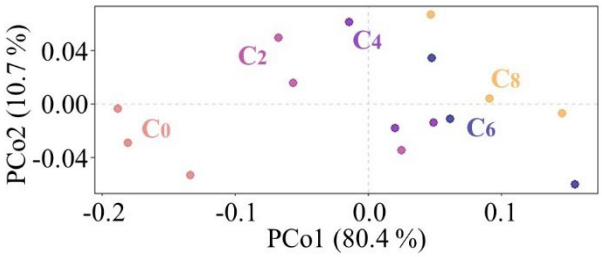


Fig. S2. Plot on the first two axis of the Principal Coordinate Analysis (PCoA) on the chemical diversity between age modalities calculated with Bray-Curtis distances. Callows were collected at different days of emergence: C0, C2, C4, C6, and C8.

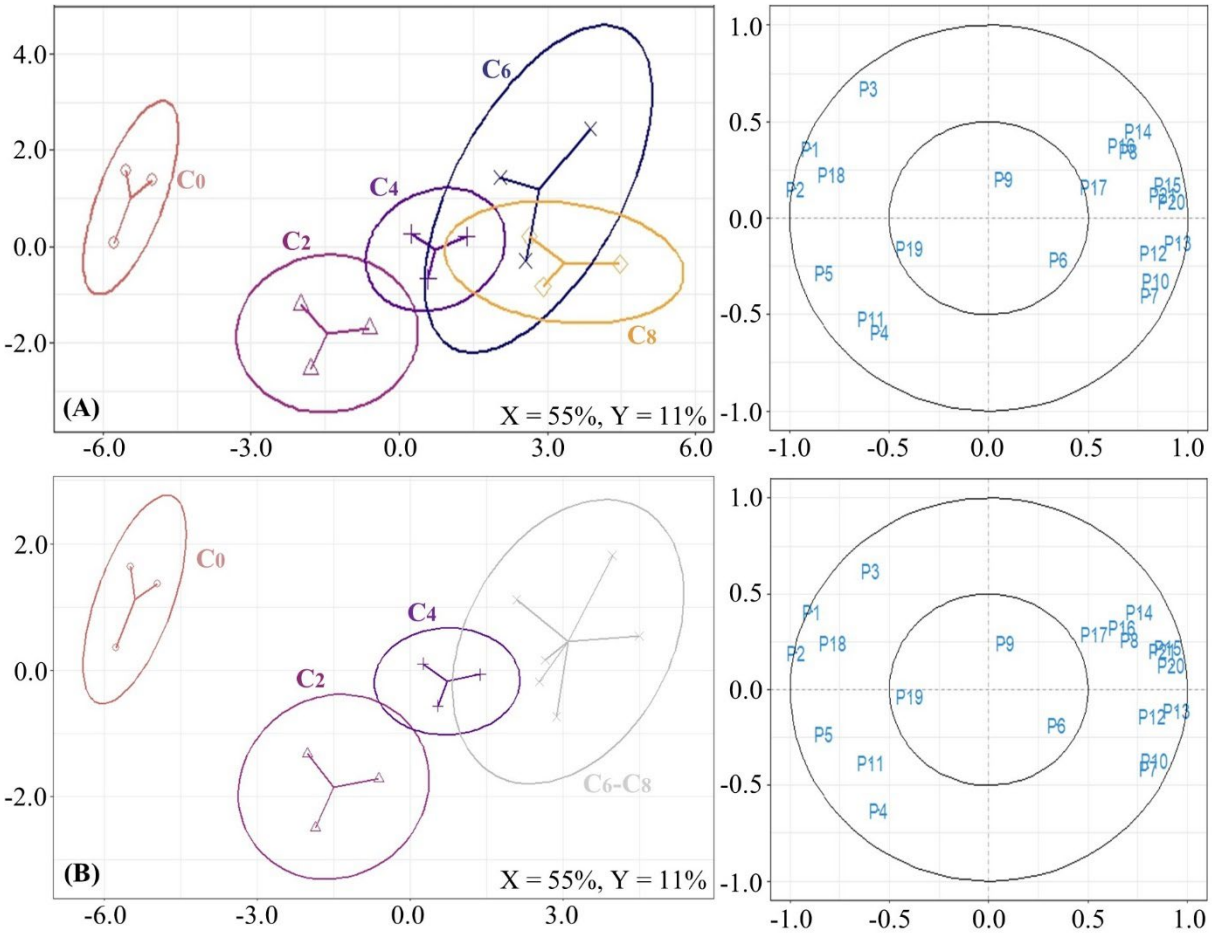


Fig. S3. Score plots and correlation circle plots on the first two axis from the chemical composition of PLS-DA models. (A) corresponds to the first model with five age classes, (B) to the second model with four age classes where C6 and C8 were clustered. Correlation circle plots allow visualizing the discriminant compounds (Table S1), and how they contribute to each component. Ellipses represent confidence levels set up at 95%.

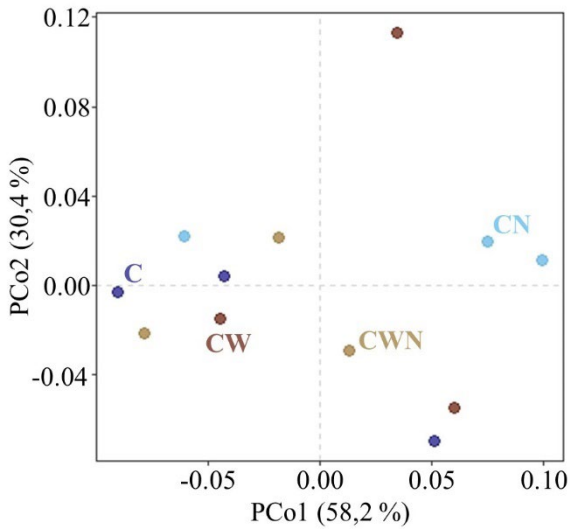


Fig. S4. Plot on the first two axis of the Principal Coordinate Analysis (PCoA) on the chemical diversity between modalities calculated with Bray-Curtis distances. Callows were placed in different conditions: Callow only (C), Callow-Nest (CN), Callow-Worker (CW), and Callow-Worker-Nest (CWN).

Table S1. Identification of the main cuticular hydrocarbons (CHCs) of callows, workers and nest materials of Vespa velutina nigrithorax. Variable Importance in the Projection (VIP) and Equivalent Chain Lenght (ECL) were calculated. PLS-DA analyses based on age resulted in VIP scores represented with * first model, ¤ second model, ♦ third model and # fourth model. The percentage and standard error were calculated for emergent individual at different ages: C0, C2, C4, C6 and C8.

Peaks	Compound identity	Retention Time (min)	VIP	ECL	C_0 %	C_2 %	C_4 %	C_6 %	C_8 %
P1	*n*-C21	27.13	*¤♦#	21.03	1.64 ± 0.45 SE	0.37 ± 0.18 SE	0.47 ± 0.30 SE	0.24 ± 0.13 SE	0.13 ± 0.06 SE
P2	*n*-C23	30.54	♦#	23.00	20.16 ± 2.60 SE	8.72 ± 2.94 SE	6.23 ± 3.02 SE	3.45 ± 1.23 SE	2.57 ± 1.39 SE
P3	X-C25:1	33.43	*¤♦#	24.76	2.22 ± 3.18 SE	1.49 ± 0.27 SE	1.75 ± 0.28 SE	1.79 ± 0.43 SE	1.30 ± 0.34 SE
P4	*n*-C25 + Unknown	33.84	*¤♦	25.00	23.02 ± 1.55 SE	24.85 ± 3.06 SE	23.02 ± 2.54 SE	19.69 ± 3.25 SE	19.50 ± 4.40 SE
P5	11- + 13-MeC25	34.36		25.33	3.044 ± 0.59 SE	2.48 ± 0.26 SE	2.13 ± 0.39 SE	1.69 ± 0.58 SE	1.66 ± 0.55 SE
P6	3-MeC25 + X-C26:1	34.99	*¤	25.74	3.37 ± 0.43 SE	3.29 ± 0.31 SE	3.78 ± 0.39 SE	3.73 ± 0.71 SE	3.80 ± 0.87 SE

P7	*n*-C26	35.40	¤♦#	26.00	0.80 ± 0.61 SE	1.13 ± 0.09 SE	1.25 ± 0.16 SE	1.23 ± 0.16 SE	1.32 ± 0.19 SE
P8	X-C27:1 + X'-C27:1	36.64		26.78	8.78 ± 1.17 SE	11.25 ± 2.96 SE	12.16 ± 2.90 SE	14.75 ± 3.42 SE	13.12 ± 3.36 SE
P9	X''-C27:1	36.74		26.84	0.62 ± 0.19 SE	0.61 ± 0.38 SE	0.56 ± 0.19 SE	0.60 ± 0.15 SE	0.61 ± 0.27 SE
P10	*n*-C27+ X-MeC27:1	36.99	*¤♦	27.00	13.88 ± 1.59 SE	18.46 ± 1.38 SE	17.90 ± 0.92 SE	18.59 ± 1.64 SE	20.12 ± 2.93 SE
P11	X'-MeC27:1 + 13-,11-,9-MeC27	37.48	*¤♦#	27.34	9.57 ± 1.00 SE	9.56 ± 0.72 SE	8.73 ± 0.85 SE	7.97 ± 0.92 SE	8.69 ± 1.36 SE
P12	11-,15-,9-,X-diMeC27	37.87	♦#	27.6	0.99 ± 0.21 SE	1.49 ± 0.23 SE	2.20 ± 0.50 SE	2.33 ± 0.62 SE	2.52 ± 0.53 SE
P13	3-MeC27	38.09	#	27.75	2.47 ± 0.39 SE	5.02 ± 0.40 SE	6.95 ± 1.15 SE	7.88 ± 1.69 SE	8.90 ± 0.58 SE
P14	5-,15-diMeC27 + 2-,13-diMeC27 + 2-,15-diMeC27	38.17		27.81	0.26 ± 0.05 SE	0.38 ± 0.08 SE	0.60 ± 0.15 SE	1.08 ± 1.58 SE	0.86 ± 0.25 SE
P15	X,X'-diMeC27 + X-MeC28	38.56	♦	28.07	0.19 ± 0.04 SE	0.42 ± 0.11 SE	0.85 ± 0.28 SE	1.24 ± 0.31 SE	1.55 ± 0.46 SE
P16	X-C29:1	39.66		28.8	3.08 ± 0.66 SE	4.36 ± 1.16 SE	4.68 ± 1.08 SE	6.41 ± 2.49 SE	5.32 ± 1.88 SE
P17	X'-C29:1 + Unknown	39.78	*	28.88	0.26 ± 0.07 SE	0.29 ± 0.18 SE	0.29 ± 0.12 SE	0.50 ± 0.19 SE	0.67 ± 0.57 SE
P18	*n*-C29	39.96	*¤#	29.00	2.25 ± 0.29 SE	1.86 ± 0.22 SE	1.72 ± 0.22 SE	1.65 ± 0.20 SE	1.69 ± 0.57 SE
P19	13-,11-,9-,7-MeC29	40.41	*¤	29.39	2.25 ± 0.18 SE	2.26 ± 0.22 SE	1.99 ± 0.19 SE	1.85 ± 0.19 SE	2.02 ± 0.43 SE
P20	5-MeC29 + 11-,15-diMeC29	40.49	¤♦#	29.71	0.64 ± 0.12 SE	1.03 ± 0.11 SE	1.62 ± 0,45 SE	1.91 ± 0.39 SE	2.04 ± 0.51 SE

P21	X,X'-diMeC31	43.69		31.63	0.47 ± 0.08 SE	0.67 ± 0.08 SE	1.12 ± 0.24 SE	1.43 ± 0.31 SE	1.60 ± 0.54 SE

Table S2. P-values obtained by pairwise comparisons for CHCs quantities between modalities. C0: callows on their first day [between 0 and 48 hours], N: nest materials and W: workers. P-values were adjusted by the Tukey method. Bold values are statistically significant ($p < 0.05$).

		C_0	N
Alkanes	N	**0.043**	-
	W	0.130	0.860
Alkenes	N	**0.005**	-
	W	0.840	**0.001**
Branched alkanes	N	0.950	-
	W	**< 0.001**	**< 0.001**

Table S3. Mean quantities (± SE) calculated for callows on their first day [between 0 and 48 hours], nest materials and workers.

	C0	N	W
Alkanes	0.016 ± 0.007	0.004 ± 0.001	0.004 ± < 0.001
Alkenes	< 0.001 ± < 0.001	0.003 ± < 0.001	0.013 ± 0.004
Branched alkanes	0.003 ± < 0.001	0.004 ± 0.001	0.011 ± 0.003

Table S4. Age cross-tabulations, showing all pairwise differences of sum relative percentages among the age of callows for each PLS-DA model. P-values are obtained by pairwise comparisons using factor fitting to an ordination. First PLS-DA model (i) with five age classes (C0, C2, C4, C6, C8), the second PLSDA model (ii) with four age classes (C0, C2, C4, C6-C8), the third PLSDA model (iii) with three age classes (C0, C2, C4-C6-C8) and the fourth PLSDA model (iv) with two age classes (C0, C2-C4-C6-C8). Bold values are statistically significant (adjusted by the False Discovery Rate, $p < 0.05$).

Models	Age	C_0	C_2	C_4	C_6
(i)	C_2	0.150	-	-	-
	C_4	0.150	0.150	-	-
	C_6	0.150	0.150	0.740	-
	C_8	0.150	0.150	0.190	0.740
(ii)	C_2	0.130	-	-	-
	C_4	0.140	0.080	-	-
	C_6- C_8	0.060	0.060	0.190	-
(iii)	C_2	0.110	-	-	-
	C_4- C_6- C_8	**0.020**	**0.044**	-	-
(iv)	C_2- C_4- C_6- C_8	**0.005**	-	-	-

Table S5. P-values obtained by pairwise comparisons of the quantities of branched alkanes according to the age of the callows. Emergent individuals were collected at different ages: C0, C2, C4, C6, and C8. P-values obtained were adjusted by the Tukey method. Bold values are statistically significant ($p < 0.05$).

	Age	C_0	C_2	C_4	C_6
Branched alkanes	C_2	0.630	-	-	-
	C_4	0.060	0.710	-	-
	C_6	**0.037**	0.570	0.990	-
	C_8	**0.003**	0.160	0.850	0.930

Table S6. Mean quantities (± SE) calculated for callows at different ages: C_0, C_2, C_4, C_6, and C_8.

	C_0	C_2	C_4	C_6	C_8
Alkanes	0.016 ± 0.007	0.007 ± 0.002	0.007 ± 0.002	0.004 ± 0.001	0.003 ± < 0.001
Alkenes	< 0.001 ± < 0.001	0.012 ± 0.004	0.013 ± 0.004	0.014 ± 0.004	0.014 ± 0.004
Branched alkanes	0.003 ± < 0.001	0.004 ± < 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001

Table S7. Mean quantities (± SE) calculated for callows. Callows were placed in different conditions: Callow only (C), Callow-Nest (CN), Callow-Worker (CW), and Callow-Worker-Nest (CWN).

	C	CN	CW	CWN
Alkanes	0.004 ± 0.001	0.008 ± 0.002	0.011 ± 0.005	0.006 ± 0.002
Alkenes	0.014 ± 0.004	0.041 ± 0.010	0.031 ± 0.010	0.025 ± 0.009
Branches alkanes	0.006 ± 0.001	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.002	0.010 ± 0.002

Partie 2 : La phéromone d'alarme

Alarm pheromone dynamic in the Yellow legged hornet,

Vespa velutina nigrithorax

In preparation as: Haouzi M., and Darrouzet E. Alarm pheromone dynamic in the Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*

Abstract

In social insects, the alarm pheromone is particularly useful in group life to protect the colony, by inducing nestmates recruitment and defence behaviours against a danger exposure. In the past, some studies investigate the alarm pheromone dynamic. Rarely species specific, this pheromone can vary depending on the caste and colony origin. In addition, its chemical composition may differ according to the age of individuals, and may be linked to an age polyethism. This study aimed to analyse the chemical composition of the alarm pheromone produced by the venom gland of the invasive Yellow legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax,* according to the age of hornets, *i.e.* in old workers, 6-days old individuals and callows just after emergence (less than 24 h). Results showed that just after emergence, callows did not possess all compounds, which suggest that the biosynthesis pathway for some compounds is not operational at this stage. The alarm chemical composition differed between individuals and demonstrating a chemical dynamic through the age of hornets. Finally, some determinant chemical compounds for each age modality were identified and imply that alarm pheromone could be used to indicate different type of informations depending on the age of individuals.

Key-words: venom gland, age, callows, Vespidae, Asian hornet

Introduction

In insect societies, the chemical communication involves a wide variety of signals that can be employed in various contexts. This plurality of chemical signals more or less volatiles, with diverse functions, makes it possible to improve the efficiency of communication systems (Bradshaw et al. 1975; Theis and Lerdau 2003). To regulate and maintain their social

organisation, social insects need an effective intra-colonial communication system. Among chemical signals, the alarm pheromone is an essential component of colonial survival and protection (Goetsch 1934). This alarm communication is particularly beneficial to group life, as it enables rapid communication, and thus the generation of appropriate collective behaviour in the face of different dangerous stimuli (Verheggen et al. 2010).

In social insects, this alarm pheromone is common (Blum 1969; Leonhardt et al. 2016), but responses to an alarm signal varying among species, caste and context (Wilson and Hölldobler 2009; Sasaki et al. 2014; Schorkopf 2016). Chemical compounds are considered to be alarm pheromones when the chemical signal is released during a dangerous situation, is perceived by conspecifics and triggers behavioural changes immediately after exposure (Verheggen et al. 2010). Depending on the species, the alarm pheromone can be stored in a wide variety of glands (Basu et al. 2021). In several species, the alarm pheromone is emitted with venom (Jeanne 1981), and stored in the venom gland (Wang et al. 2016; Cheng et al. 2017). This pheromone can induce two main responses: a panic response when individuals disperse and flee the emission, or an alarm response when individuals are attracted to the source of emission and attack (Wilson and Regnier 1971). When colonies are threatened, this pheromone is primordial to colonial survival, because it can induce nestmates recruitment and aggressive behaviours (Boch and Shearer 1971; Bruschini et al. 2008b). It is the case in ants where the alarm pheromone emission induces aggressive behaviours in conspecifics (Hölldobler and Wilson 1990). The alarm pheromone action depends to its chemical composition (chemical nature of compounds), but also on the relative proportion of all compounds (Wadhams 1990). These compounds can act on insect behaviour in synergy (Cheng et al. 2017) or alone (Heath and Landolt 1988; Alaux and Robinson 2007).

A great part of scientific literature has studied the dynamic of the alarm pheromone between individuals. The alarm pheromone is rarely species specific. Indeed, its composition

between the ant species *Atta bisphaerica* and *Atta capiguara* is similar (Hughes et al. 2001). Moreover, in *Oecophylla longinoda* ants, chemical differences between castes and colonies have been highlighted (Bradshaw et al. 1979c). In *Hodotermopsis japonica* termites, genes expression and histological (cells) differences of the mandibular gland, the organ which produces the alarm pheromone, have been demonstrated during soldiers differentiation (Miura et al. 1999), thus suggesting that the alarm pheromone composition changes during their differentiation. In social insects, polyethism may be based on the age of workers, and variations of the alarm pheromone composition have been demonstrated between them (Hughes et al. 2001). It is therefore possible that the alarm pheromone composition evolves with the age of individuals. In *Platythyrea punctate* ants, the amount of two compounds was lower in young individuals, which performed tasks inside the nest, compared to foragers, which are the older individuals (Pokorny et al. 2020). It is therefore likely that the alarm pheromone is dynamic through the life cycle of individuals.

In this study, we focused on a Vespidae alarm pheromone, in the invasive Yellow legged hornet, *Vespa velutina nigrothorax*. This hornet was accidentally introduced in France, in 2004 (Arca et al. 2015). It then spread rapidly and invaded several countries in the Western Europe (Robinet et al. 2018). This species induces numerous negative impacts. It is a generalist insects predator which affects the entomofauna (Rome et al. 2021), and especially honey bee populations, thus causing important economic losses for beekeeping activities (Requier et al. 2018, 2019; Laurino et al. 2019; Leza et al. 2019). It is also well known to impact pollination (Rojas-Nossa et al. 2023) and to cause human health problems (Beggs et al. 2011; Laborde-Castérot et al. 2021). The control of this invasive species seems essential. However, no effective and specific trap exist at the present time (Turchi and Derijard 2018). The study of its chemical communication system is therefore important to find putative attractive or repellent compounds. Few studies investigate the alarm pheromone composition in the Yellow-legged hornet.

Numerous chemical compounds have been identified and some elicited attack behaviours when colonies were threatened (Cheng et al. 2017; Thiéry et al. 2018). Also, a chemical differentiations have been highlighted between castes (Rodríguez-Flores et al. 2021b; Berville et al. 2023). Nevertheless, responses to several questions about the production and regulation of such alarm pheromone are still lacking in this species, as for example its chemical composition according to the age of the individuals. We hypothesized that the composition of the alarm pheromone could be dynamic through the life cycle of hornets. To answer this question, the aim of this study was to analyse the venom gland composition according to the age of the Yellow legged hornet workers.

Materials and Methods

Hornets sampling

In France, Centre Val de Loire region, Indre et Loire department, 7 *Vespa velutina nigrithorax* colonies were sampled in 2021. Workers were captured in the field, outside the colony and were frozen killed in the laboratory. These workers had an unknown age but were considered in this study as the oldest individuals. Also, combs which contained brood were separated from the nest and placed in breeding boxes at ambient temperature. Each day, combs were checked and emerging female hornets, called callows (C), were isolated in breeding boxes with honey and water *ad libitum*. Then for each nest, callows were frozen killed the day of their birth (C_0, individuals less than 24 hours), or 6 days after their birth (C_6, individuals between 144 and 168 hours). In a previous study on this species, 6-day-old individuals had a stable chemical signature (Haouzi et al. in prep, **Chapitre 2**), so we supposed that the alarm pheromone composition will be representative of stable stage at this age. For each age modality, one individual per nest was studied (N = 21).

Chemical extractions

Under binocular microscope, the venom gland of each hornet was dissected, and placed in a glass vial with 200 µl of heptane and stored at -20°C. Immediately before analyses, glands were crushed and 0.5 µl of internal standard *n*-eicosane (10^{-3} g/ml) was added to each sample. Samples were then vortexed at 300 rpm for 1 min, and 2 µl of each sample was analysed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC 7890B – MS 7000C Triple Quad, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Chemical extracts were injected in the GC injector with a splitless time of 2 min at a constant temperature of 250°C. The carrier gas (flow rate=1.2 ml/min) was helium and a Zebron ZB-5HT column (30m L x 0.25mm ID x 0.25 µm df; 5% Phenyl - 95% Dimethylpolysiloxane, Phenomenex, Torrance, CA, USA) equipped the GC. Electron impact ionization were 70 eV. The oven temperature program as follows was used: an initial temperature ramp from 50°C to 200°C at 8 °C/min, following by a second ramp from 200°C to 315°C at 5°C/min, and a 5-min final hold at 315°C. Data were analysed with both MassHunter Qualitative Analysis (v. 10.2, Agilent) and AMDIS v. 2.0g, NIST 2017 softwares. Then, chemical compounds were identified based on fragmentation patterns of their mass spectra (McLafferty F and Turecek F 1993) and according to previous *V. velutina nigrithorax* spectra published (Berville et al. 2023). To finish, chromatograms integration was performed with MassHunter Quantitative Analysis software (v. 10.2, Agilent technology).

Statistical analyses

First, the age effect was estimated on the hornets' chemical composition with a Permutational Analysis of Variance (PERMANOVA, n = 999 permutations) test on the Bray-Curtis dissimilarity matrices calculated between each pair of samples. The adonis2 function was used from the vegan package (v2.6-2) (Oksanen et al. 2022). Then, pairwise comparisons were carry out with the pairwise.adonis function from the pairwiseAdonis package (v0.4) (Martinez Arbizu 2017). Lastly, with the use of ape package (v5.6-2) (Paradis and Schliep

2019), a Principal Coordinate Analysis (PCoA) was performed to illustrate the chemical composition dissimilarities between samples.

Then, to identify chemical compounds which explained differences between old workers, 6-days old individuals (C_6) and just emerged callows (C_0), a Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) algorithm was performed. First, a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) sum-rank test following by a pairwise Wilcoxon test, were used to estimate the differential abundance and chemical consistency, with alpha values of 0.05. Then, to estimate the effect of chemical compounds according to the age of callows, a Linear Discriminant Analysis (LDA) was performed with a threshold of 2 for logarithmic scores.

Results

A total of 15 chemical compound from 9 to 11 carbons have been found and analysed. Among them, 6 were ketones, 2 esters, 4 alcohols and 3 unknown compounds. All compounds were present in each modality, except the cyclohexanol (P4) which was absent in callows C_0 (**Table 1**).

Table 1. Alarm pheromone compounds from venom gland of *Vespa velutina nigrithorax* old workers and callows at two different ages. C_0 corresponds to callows sampled just after their emergence (less than 24 hours) and C_6 to 6-days-old callows (between 144 and 164 hours). The relative abundances of each compound are represented for each hornet (Means ± SE). **Bold values** correspond to determinant chemical compounds of age modality find in the LEfSe test.

Peak	Chemical compounds	C_0	C_6	Workers
1	Nonan-2-one	4.669 ± 1.860	**14.742 ± 3.523**	5.571 ± 1.957
2	Nonan-2-ol	**33.353 ± 7.654**	8.179 ± 1.791	0.779 ± 0.148
3	Isoamyl isovalerate	7.115 ± 1.855	2.507 ± 0.944	18.110 ± 6.372
4	Cyclohexanol	0.000 ± 0.000	0.023 ± 0.023	**3.104 ± 1.803**
5	X-C12:1 + 4,8-diMe-1,7-nonadiene	4.512 ± 1.158	3.478 ± 1.880	4.061 ± 1.232
6	Unknown 1	0.468 ± 0.468	1.370 ± 0.974	3.495 ± 1.667
7	4,8-diMe-7-nonen-2-one	6.590 ± 1.544	17.706 ± 5.820	16.113 ± 5.951
8	2-Nonanyl, 2-acetate	**13.673 ± 1.064**	9.944± 2.244	3.200 ± 1.093
9	B-Citronellol, methyl ether	**8.076 ± 3.217**	6.064 ± 1.167	0.888 ± 0.346
10	X'-Undecen-2-one	2.238 ± 1.412	3.837 ± 0.701	1.989 ± 0.957
11	X-Undecen-6-one	3.083 ± 1.259	2.502 ± 1.340	**15.156 ± 1.751**
12	Undecan-2-one	1.176 ± 0.480	**5.786 ± 0.546**	3.927 ± 1.140
13	Unknown 2	4.225 ± 0.982	8.919 ± 1.764	**11.836 ± 3.323**
14	Decane-2,9-dione + unknown 3	5.100 ± 2.828	0.876 ± 0.325	9.638 ± 3.051
15	Unknown 4	5.723 ± 2.035	14.068 ± 6.074	2.133 ± 0.731

The age of hornets significantly influenced the variability in the venom gland chemical composition among individuals and explaining 41% (PERMANOVA, $R^2 = 0.413$, $p = 0.001$) of the variance in the chemical profile (**Fig. 1**). Compared in pairs, old workers are both

significantly different from C_0 (p = 0.003) and C_6 (p = 0.006), which are also significantly different between them (C_0 *vs* C_6) (p = 0.009).

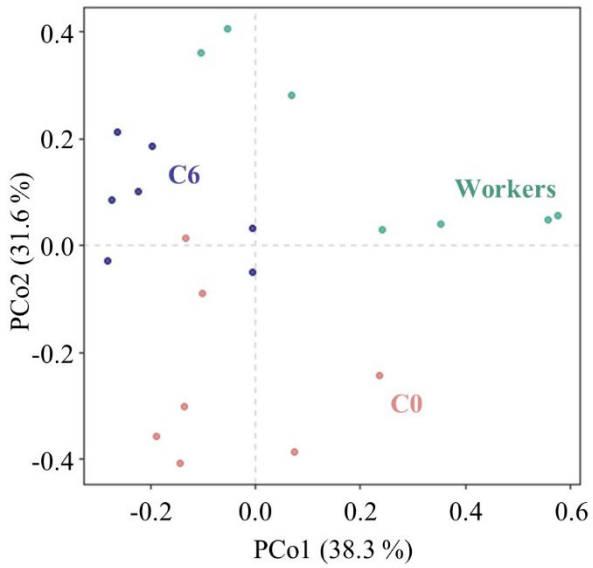


Fig. 1. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot illustrating the chemical dissimilarities between pairs of *Vespa velutina nigrithorax* chemical compounds at different ages. C_0 corresponds to just emerged callows (less than 24 hours), and C_6 to 6-days-old callows (between 144 and 164 hours). Workers are considered to be the oldest individuals, and their age could not be determined.

With the model including all age modalities with old workers, 6 days old individuals (C_6) and callows just after emergence (C_0), 8 chemical compounds explained chemical differences between hornets (**Fig. 2**). X-Undecene-6-one (P11), Unknown 2 (P13) and Cyclohexanol (P4) are discriminant for old workers, Nonan-2-one (P1) and Undecan-2-one (P12) for callows C_6, and Nonan-2-ol (P2), 2-Nonanyl-2-acetate (P8) and β-Citronellol-methyl-ether (P9) for callows C_0.

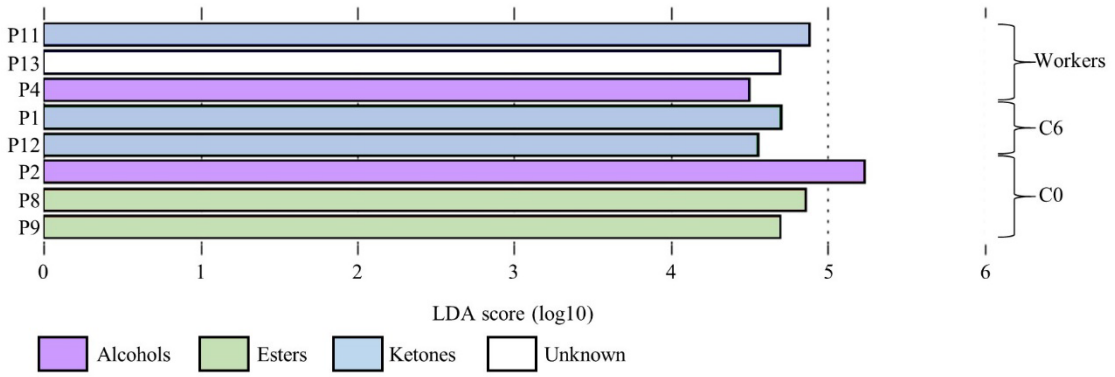


Fig. 2. LEfSe representing discriminant chemical compounds (LDA score (log10) > |2,5|; $p < 0.05$). The chemical compounds contribution at peak level is tested between old workers, C_6 and C_0. C_6 corresponds to 6-days-old callows (between 144 and 164 hours) and C_0 to just emerged callows (less than 24 hours).

Discussion

In this study, a chemical evolution of the alarm pheromone has been highlighted as a function of the age of workers. We show that the venom gland composition is different between callows just after emergence, called C_0, 6 days later called C_6 and workers, individuals considered to be older. In each age modality, all chemical compounds have been found, except in 0-day old callows (C_0), where the cyclohexanol was absent. As they remain inside the nest, it is therefore possible that this compound was not necessary immediately after emergence. Indeed, during few days, there are unable to sting (personal communication), and this compound may not be essential at this stage, since they do not participate to the colony defense. In some ants species, the alarm pheromone composition is different between young and old individuals (Haight 2012; Pokorny et al. 2020), suggesting that the biochemical pathways that produce this pheromone, is not totally active and operational when individuals are young. In social insects, the alarm pheromone biosynthesis pathway includes fatty acid metabolism (Martin and Jones 2004; Esteves et al. 2017). It is therefore possible that fatty acids biosynthesis for some compounds requires more time to be operational after emergence. In this study, the alarm pheromone evolves with the age of individuals, suggesting that young hornets begin their

adult life with few and not all compounds, as demonstrated in the poison gland in *Harpegnathos saltator* (Haight 2012).

In *V. velutina nigrithorax*, chemical differences between females have been demonstrated (Berville et al. 2023). More specifically, the alarm pheromone composition of fertile females was different during their biological cycle from gynes to foundresses to queens (Berville et al. 2023). Another study demonstrates that the alarm pheromone was different in workers according to their activity performed (Haouzi et al. in prep, **Chapitre 3**). All these results in the Yellow legged hornet show that the alarm pheromone is dynamic through the life cycle of hornets and as a function of their age. However, contrary to our hypothesis, the chemical composition in 6-day old callows (C_6) is different from individuals considered to be oldest workers. This result suggests that the alarm pheromone in the venom gland evolves over the long term, as demonstrated in ants *Harpegnathos saltator* (Haight 2012).

Some determinant chemical biomarkers have been identified for each age modality. These compounds could be used for different behaviours as a function of the age of hornets. For example, the unknown 2 compound and the X-Undecene-6-one are chemical determinants in old workers. Both were major compounds in females, particularly in queens, and were released when individuals were stressed (Berville et al. 2023). It is therefore possible that these compounds are important signals which induce defensive behaviours when colonies are threatened. These compounds could be recognised by all conspecifics to protect the queen and the colony. The cyclohexanol is also a chemical biomarker of old workers. This compound which was absent in callows C_0 and in very low concentration 6 days later (C_6) could only be used by older individuals. Interestingly, this compound does not seem to be released by hornets when they were stressed (Berville et al. 2023), suggesting that it is not used to induce defensive behaviour. Its function remains to be elucidated.

Six days after emergence (C_6), chemical biomarkers are Nonan-2-one and Undecan-2-one. The Nonan-2-one has been shown in the Yellow legged hornet to be a major compound in the European invasive population (Thiéry et al. 2018; Berville et al. 2023) and Undecan-2-one in the Chinese native population (Cheng et al. 2017). The Undecan-2-one is a common alarm compound in Vespidae. It has been found in *Vespa orientalis* (Saslavasky et al. 1973) and *Dolichovespula Maculata* (Jimenez et al. 2016), but also in *Polistes* (Bruschini et al. 2007). This ketone is a chemical compound that can provoke attack behaviours in *Vespa orientalis* (Saslavasky et al. 1973), but no behaviour is known in *Dolichovespula Maculata* (Jimenez et al. 2016) and *Polistes* species (Bruschini et al. 2007). These two chemical compounds were identified when hornets were stressed (Berville et al. 2023), thus suggesting their involvement in alarm behaviour.

In callows C_0, Nonan-2-ol, 2-Nonanyl-2-acetate and β-Citronellol-methyl-ether are chemically discriminant. The 2-Nonanyl-2-acetate and β-Citronellol-methyl-ether were identified for the first time to have potential toxicity actions in *V. velutina nirgithorax* (Berville et al. 2023). In other Hymenoptera, the Nonanyl-acetate have been found in very high concentrations in the venom of different paper wasp species (Bruschini et al. 2006). It is therefore a common compound. The Nonan-2-ol is also a common compound in the Yellow legged hornet and the second most abundant in workers, pre-wintering gynes, and foundresses (Berville et al. 2023). Likewise, in flowers of *Ceropegia gerrardii* use it to mimic injured honey bees to attract pollinators (Heiduk et al. 2023). This compound could be used by callows to signal a wound or health problem in order to prevent nestmates.

To conclude, the alarm pheromone from the venom gland is dynamic with age in the Yellow legged hornet. Six days after birth, this pheromone does not correspond to the old workers stage, contrary to our hypothesis. Some compounds have been identified to be specific to a particular age. This chemical distinction between hornets could indicated different types of

signals, and thus different use and responses, but behavioural tests are necessary to test this hypothesis.

Chapitre 3 : Spécialisation chimique des ouvrières et odeur coloniale



Chapitre 3 : Spécialisation chimique des ouvrières et odeur coloniale

Résumé du chapitre

Chez les insectes eusociaux, la division du travail des ouvriers est une composante clé au succès écologique des insectes. Au sein d'une même caste, les individus vont se spécialiser dans un sous-ensemble de tâches, et une diversité de comportements peut être observée. Ils peuvent par exemple s'occuper du soin au couvain, de la protection ou de la construction de la colonie, mais aussi de la recherche de ressources. Chaque type d'ouvrier peut être identifié chimiquement grâce à des substances sémiochimiques. Parmi elles, les CHCs qui peuvent être considérés comme des « phéromones de contact », sont utilisés dans la reconnaissance intraspécifique, et peuvent varier qualitativement et/ou quantitativement selon les individus et leur origine coloniale. Également, la phéromone d'alarme qui est quant à elle en grande partie volatile, pourrait être utilisée comme un signal de reconnaissance et induire différents comportements des congénères. Ce chapitre avait pour but d'analyser la communication chimique chez les ouvrières *V. velutina nigrithorax* afin de mieux comprendre leur organisation sociale. C'est pourquoi, différents comportements assignés à des activités coloniales ont été identifiés et le profil chimique de chaque type d'ouvrière a été analysé pour les CHCs et la phéromone d'alarme.

Les observations comportementales sur le terrain ont permis d'identifier 4 types d'ouvrières en fonction de leur activité, à un instant donné. Parmi elles, se distinguaient les bâtisseuses qui construisent le nid, les gardiennes qui attaquent lorsque la colonie est menacée et deux types de fourrageuses. Les fourrageuses de type animal correspondant aux ouvrières qui partent chasser des proies, les transforment en boulette et les rapportent à la colonie afin de nourrir les larves à l'intérieur du nid. Les fourrageuses de type matériaux qui ramènent quant à elles, des boulettes composées de fibres végétales malaxées à de la salive, utilisées dans la construction du nid.

Les analyses concernant la signature chimique ont révélé une hétérogénéité chimique chez les ouvrières, avec les fourrageuses de type animal qui se distinguaient nettement des autres ouvrières. Des CHCs discriminants les groupes d'ouvrières ont également été identifiés. Parmi eux, des composés avaient été identifiés comme des indicateurs d'âge chez d'autres espèces, suggérant ainsi la présence d'un polyéthisme d'âge chez les ouvrières du frelon à pattes jaunes. De la même manière, les analyses concernant la composition de la glande à venin ont démontré que les fourrageuses de type animal étaient à nouveau chimiquement différentes des autres ouvrières. Également, les bâtisseuses se distinguaient des autres femelles effectuant d'autres activités. À nouveau, des composés chimiques ont été identifiés comme discriminants pour les différents types d'ouvrières. Ces résultats suggèrent ainsi que selon leur activité, les ouvrières pourraient utiliser la phéromone dite d'alarme pour communiquer divers messages à leurs congénères.

Également, au cours de ce chapitre, une spécialisation coloniale de la phéromone d'alarme a été mise en évidence, et celle de la signature chimique a été confirmée. Ces résultats ont donc souligné le fait que la phéromone d'alarme pourrait être utilisée comme un signal de reconnaissance à distance chez les frelons afin de discriminer les congénères des intrus, tout comme les CHCs au contact. Cette hétérogénéité coloniale du signal d'alarme pourrait aussi permettre de diminuer la compétition chez cette espèce, en marquant par exemple des ressources.

Ce chapitre a donc permis d'identifier différentes activités exercées par les ouvrières. Une spécialisation chimique de ces ouvrières a été mise en évidence, avec une nette séparation des fourrageuses de type animal par rapport aux autres ouvrières présentant d'autres activités. Comme observé chez d'autres espèces d'Hyménoptères, ces travaux ont mis en lumière une spécialisation des tâches chez le frelon à pattes jaunes avec probablement un phénomène de polyethisme d'âge. Enfin, une forte signature coloniale a été mise en évidence, que ce soit pour

la phéromone d'alarme et les CHCs, indiquant ainsi leur possible implication dans la reconnaissance des congénères.

Partie 1 : La signature chimique

A smell for a task? The chemical signature differs between colonial activities in the Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*

In preparation as: Haouzi M., Bastin F., Cheutin MC., Lucas C, Perdereau E., and Darrouzet E. A smell for a task? The chemical signature differs between colonial activities in the Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*.

Abstract

Labour division in insect societies is a major component explaining their ecological success. Workers contribute to the colonial survival by exerting different tasks within their colony, and identified by conspecifics through chemical communication. Cuticular Hydrocarbon Compounds are used like contact pheromones for recognition behaviours. These pheromones which can vary qualitatively and quantitatively, represent the chemical signature of the individual, giving it its identity to congeners. In some eusocial insects, a task specialisation phenomenon has been highlighted and could be related to their cuticular profile. In this study, we analysed the chemical signature of an eusocial and invasive Vespidae, the Yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax.* In this species, the chemical communication system between workers is unknown and their social organisation poorly documented. The aim of this study was to analyse the chemical signature of workers according to their activities. Four distinct activities were identified: animal foragers, builders, guardians and material foragers. For each type of workers, their chemical signatures were analysed and results showed that animal foragers exhibit a clear putative specialisation of their chemical profiles compared to their counterparts with discriminant Cuticular Hydrocarbons Compounds.

Keywords: Vespidae, cuticular hydrocarbons compounds, division of labour, Asian hornet

Introduction

Division of labour in social insects is a major evolutionary transition of the eusociality that takes part in their ecological success in several environments (Wilson 1971). The division of labour is characterized by different tasks carried out by nestmates in order to improve the overall efficiency of the colony (Duarte et al. 2011). Workers can therefore specialize in different tasks such as brood care, nest building, defence and foraging (Wilson 1971) influenced by several intrinsic factors (*e.g.*, morphology, genetic variation, ontogeny) and external factors (*e.g.*, diet, life experience, chemical stimulation) (Duarte et al. 2011). This behavioural plasticity is also modulated by chemical pathways as pheromone emissions (Wyatt 2003b) that influence the physiological and endocrine processes of the recipient affecting *in fine* behaviour (Vander Meer et al. 1998; Blomquist and Bagnères 2010a). Several studies have shown that the chemical signature of insects is complex and dynamic, varying quantitatively and qualitatively (Bonavita-Cougourdan et al. 1993; Lucas et al. 2002; Blomquist and Ginzel 2021). The Cuticular Hydrocarbon Compounds (CHCs) have a major role in communication systems (Blomquist and Bagnères 2010a) and strongly contribute to the evolutionary success of insect societies (Leonhardt et al. 2016). CHCs are composed of a blend of homologous series of long straight-chain compounds saturated or not, which can be modified by the introduction of methyl groups, inducing complex profiles with functional differences and waterproofing capabilities (Martin and Drijfhout 2009; Blomquist and Bagnères 2010a; Ginzel and Blomquist 2016).
Mainly known to protect insects from desiccation (Gibbs 1998, 2002), CHCs can be used as contact pheromones for inter and intra-specific recognition and are considered as the chemical signature of insects (Blomquist and Bagnères 2010a; Ginzel and Blomquist 2016). Indeed, the ability to discriminate members of the colony from intruders is essential for the organization of insect societies (Tsutsui 2004; Howard and Blomquist 2005). In addition, chemical cues are generally used to recognize nestmates (Van Zweden and D'Ettorre 2010) in social insects, and

can be seen as a "visa" that transmits the identity of individuals to congeners (Fresneau and Errard 1994; Soroker et al. 2003). Workers can have different cuticular profiles according to their task performance in the colony, for example in stingless bees as *Melipona marginata* (Ferreira-Caliman et al. 2010), in honeybees as *Apis cerana* (Rahman et al. 2016), or in ants such as *Camponotus vagus* and *Myrmicaria eumenoides* (Bonavita-Cougourdan et al. 1993; Kaib et al. 2000). Finally, CHCs play an important role in collective behavioural regulation, such as task decision. It has been demonstrated that the use of artificial ants chemically treated, induce behavioural modulations in *Pogonomyrmex barbatus* (Greene and Gordon 2003; Greene 2010).

In Vespidae workers, a task specialisation related to CHCs has never been demonstrated to our knowledges. Nevertheless, in wasps *Polybia aequatorialis*, a foraging task specialisation between material and prey resources has been highlighted (O'Donnell and Jeanne 1990). Moreover, in this species, neuroanatomical changes have been related between tasks when workers performed these inside the nest, on the nest or outside for foraging (O'Donnell et al. 2004), thus suggesting that morphological or physiological changes can be associated to the task performed. This neuroanatomical plasticity related to the DOL has also been demonstrated in other Hymenopteran species where the chemical task specialisation is highly documented, such as in ants (Gronenberg et al. 1996) or honeybees (Withers et al. 1993; Farris et al. 2001).

The Yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax,* was accidentally introduced around 2004 to southwest France (Haxaire et al. 2006) from the southeast Asia (Arca et al. 2015). It then quickly invaded numerous countries throughout the west Europe (Robinet et al. 2018). This invasive species has negative impacts on entomofauna (Rome et al. 2021), and especially on honeybee's populations (Requier et al. 2018, 2019; Leza et al. 2019) causing major economic losses (Darrouzet 2019; Laurino et al. 2019) with public human health issues (Beggs et al. 2011; Laborde-Castérot et al. 2021). While hornet population from Europe is

inbreeded (Arca et al. 2015; Darrouzet et al. 2015b), their chemical signature is heterogeneous according to caste, gender, and colonies (Gévar et al. 2017). Also, their chemical signature evolves rapidly, during the first 48 hours after emergence (Haouzi et al. in prep, **Chapitre 2**). Current knowledges about workers' colonial activity in this invasive species are poorly documented. Three major behaviours have been identified in *V. velutina nigrithorax* : nest maintenance, nest patrolling and foraging (Monceau et al. 2017). For nest maintenance, workers expand the nest by adding layers of plant fibers or deposit water on the nest to cool it using their wings to evaporate water (Perrard et al. 2009). With age, the nest defence by workers and the aggressive behaviour towards males of the colony increases (Monceau et al. 2013). Lastly, for foraging behaviour, the Yellow-legged hornet is a generalist scavenger or predator that hunts its preys (*e.g.*, honeybees, flies, or social wasps) and transforms it into a chewed pellet that is taken to the nest in order to feed larvae (Matsuura and Yamane 1990; Rome et al. 2021). Thus, understanding how *V. velutina nigrithorax* maintains its colonies (social groups) and their communication systems is of major interest to apprehend their invasion success. Here, we aimed to analyse in 10 French nests of the hornets *V. velutina nigrithorax,* the influence of four different activities (*i.e.* animal and material foragers, builders and guardians) in the determination of their chemical cuticular profiles. We hypothesized that workers will present a chemical variability according to their activities. These different CHCs profiles could inform conspecifics for their role in colonies.

Materials and Methods

Hornet collection and colonial activity assignment

A total of 164 *V. velutina nigritorax* from 10 colonies were sampled in France between mid-August and mid-October of 2021 (**Fig. 1**). The field area was unimpeded to secure the manipulation of the nest by experimenters. If necessary, nest entrance was cleared of

vegetations, and nest was left to rest for 30 minutes. Hornet workers were identified following their behaviours. Four activities of workers were identified: animal foragers, builders, guardians, and material foragers. To identify hornets which defend the nest, called guardians in this study, a 2 m wooden stick, at 30 cm from the nest entrance was moved with regular circular movements. Workers attacking the stick were considered as guardians. Workers observed on the nest surface near a wet strip and/or observed during building processing were considered as builders. As demonstrated in Vespidae, we distinguished two types of foragers (animal or material) according to the nature of the pellets they held in their mandibles. Pellets containing a mix of vegetables fibers and saliva were considered as material while those containing preys (*e.g.*, insect heads, exoskeleton carcass…) as animal pellets. Each hornet was collected and isolated in independent vials. For each type of workers, four individuals were collected in each nest, except for Amboise (animal forager, n = 5), Ballan-Miré (animal forager, n = 6) and Villedieu-les-Poêles (material forager, n = 5).

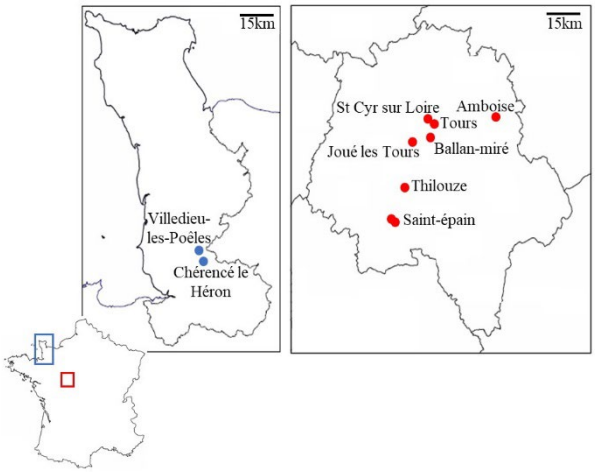


Fig. 1. Cartography of hornet's colonies sampled in France. Blue cities correspond to the department of La Manche and red cities to the department of Indre et Loire.

Cuticular hydrocarbons analyses

Hornets were frozen killed at -20°C and CHCs were immediately extracted in the laboratory (Gévar et al. 2017). Each hornet was place head down in a concave glass vial with 1 ml of heptane, and vortexed 1 min at 300 rpm. Then, the hornet was placed head up and vortexed again during 1 min at 300 rpm. For each sample, 500 µl of extracts were placed in new glass vials. Samples were stored at -20°C until chemical analyses. Ten µl of n-eicosane at 10^{-3} mg/µl were added just before chemical analyses to serve as internal standard. Samples were vortexed after the standard additions.

Chemical samples were analysed using a gas chromatograph Agilent 7890B coupled with a mass spectrometer Agilent 7000 Triple Quad (Les Ulis, France). Using an autosampler (Gerstel, RIC, Belgium), 2 µl of each extract was injected in the GC injector in splitless mode with a splitless time of 2 min at a constant temperature of 250° C. The GC was equipped with a Zebron ZB-5HT column (30m x 0.25mm x 0.25 µm; 5% Phenyl - 95% Dimethylpolysiloxane, Phenomenex, Torrance, CA, USA) with helium as carrier gas (1.2 ml/min). The temperature program increased 50°C to 200°C at 8 °C/min, followed by a second temperature ramp from 200°C to 315°C at 5°C/min, and a 5-min final hold at 315°C. Electron impacts was setup at 70 eV. Mass spectra were recorded in scanning mode every 0.3 sec with a scan interval of 0.1 sec and a mass scan range of 40–600 amu, driven with the software Agilent MassHunter B.07.00. Data were analysed with the softwares MassHunter Qualitative Analysis (v. 10.0, Agilent), and AMDIS v. 2.3, NIST 2017. Compounds (**Table S1**) were then identified thanks to their mass spectra, fragmentation analyses (McLafferty F and Turecek F 1993), and according to previous published spectra (*e.g.* Gévar et al., 2017). Peaks integration was done using the MassHunter Quantitative Analysis software (v. 10.2, Agilent technology).

Activity effect on the CHC's profiles

Because both a colonial heterogeneity in the Yellow legged hornet has been previously demonstrated and to avoid pseudo replication, technical replicates (*i.e.* sample replicates by worker activity by nest) were pooled and averaged for all statistical analyses. The relative quantity of CHCs by sample is calculated by dividing the surface of each peak by the sum of all the peaks. We also calculated the relative abundances at chemical family level (alkanes, alkenes and branched alkanes) by dividing the area of each peak by the sum of the peaks belonging the chemical family. Not knowing the proportion of the different compounds in the mixtures, CHCs that belonged to mixed families were excluded from the analyses at family level.

To test the influence of the activity effect on the chemical signature of the Yellow-legged hornet on all the CHCs and at chemical family level, we performed four Permutational Analysis of Variance (PERMANOVA, n = 999 permutations) on the Bray-Curtis dissimilarity matrices calculated with the relative abundance of CHCs between each pair of samples, using the adonis2 function from the vegan package (v2.6-2) (Oksanen et al. 2022). When significant effect was observed, pairwise comparisons were performed using the pairwise.adonis function from the pairwiseAdonis package (v0.4) (Martinez Arbizu 2017). Chemical composition dissimilarities between each sample were illustrated with a two-dimensional Principal Coordinate Analysis (PCoA) performed using the ape package (v5.6-2) (Paradis and Schliep 2019). The colony effect on the global CHCs composition was also tested with a PERMANOVA test.

Then, non-parametric Kruskal Wallis tests were performed to see if the sum of the relative abundance of each chemical family on the total signature differs between workers' activities. When significant effect was observed, Dunn's tests with Bonferroni correction were performed

to determine which types of workers are chemically different, using FSA (v0.9.3) (Ogle et al. 2022) and dunn.test (v1.3.5) (Dinno 2017) packages.

To clustered workers' activities according to their chemical similitudes, Partial Least Squares – Discriminant Analysis (PLS-DA) were performed using mixOmics (v6.16.3) and RVAideMemoire (v.0.9-81-2) packages (Rohart et al. 2017; Hervé 2022). Three PLS-DA models were performed: i) all activities group *(i,e.,* animal foragers, builders, guardians, material foragers), ii) three activities group with Builders and Guardians clustered and called BG *(i.e.*, animal foragers, BG, material foragers) and iii) two activities group with Builders, Guardians and Material foragers clustered and called BGM (*i.e.*, animal foragers, BGM). The Classification Error Rate (CER) computed using a double cross-validation scheme was calculated to assess the performance of each model (Brereton and Lloyd 2014). The average CER were used to conclude on the significance of the differences between clusters with 999 permutations (Westerhuis et al. 2008). Then, pairwise correlation tests based on cross model validation were performed for each model to determine the relationships between workers activities' clusters. P-values were corrected with the False Discovery Rate (FDR) method (Benjamini and Hochberg 1995). Variable Importance in the Projection score (VIP) measured the variable's importance in each PLS-DAs (Hervé et al. 2018; Hervé 2022).

CHC's differential abundances among activities

The chemical peak biomarkers of animal foragers and other workers clustered (Builders, Guardians, Materials foragers = BGM) were identified using the LEfSe algorithm (Segata et al. 2011). First, a non-parametric Kruskal-Wallis sum-rank test indicating the significant differential abundance of workers activities was performed. Then, the Linear Discriminant Analysis (LDA) allowed to estimate CHCs effects according to activities. Alpha values of 0.05 were used for Kruskal-Wallis test, and a threshold of 2 was performed for logarithmic LDA scores.

For each worker, the quantity of each chemical compound was estimated with the following formula: $Qi = (Q_{C20} \times Xi) / (X_{C20})$, where Q corresponds to the absolute quantity, X to the peak area and C20 to the internal standard. Quantities of each chemical compound were divided by the mass of each hornets individually to obtain the CHC quantities per-gram per individual.

To analyse which CHCs quantities differed between animal foragers and other workers clustered (BGM), non-parametric Kruskal Wallis tests were performed for each chemical family.

All statistical analyses were performed using R software (R v4.1.0), except the LEfSe algorithm which was performed on Galaxy Community Hub.

Results

A total of 44 CHCs was described and belonged to three chemical families of which 25 belong to branched alkanes (56,82%), 6 to alkenes (13,64%), 5 to alkanes (11,36%) and 8 to a mix of compounds (18,18%) (**Table S1**).

Activities effect on the CHC's profiles

Activities significantly influenced the variability in the chemical compound compositions among worker hornets (PERMANOVA, $R^2 = 0.325$, $p = 0.001$). The ordination of the different workers in a two-dimensional PCoA showed a separation between animal foragers and other workers (**Fig. S1**) which explained 32% of the variance in the chemical constitution. In addition, the colony effect was significant determinant of the chemical signature explaining 45% of the chemical compounds' variability ($R^2 = 0.454$, $p = 0.002$).

Regarding the total chemical composition, alkenes (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) and branched alkanes ($p < 0.001$) abundances are significantly different according to worker' activities, but not for alkanes ($p = 0.498$). Compared in pair, animal foragers have a cuticular

profile different from the other analysed workers for alkenes and branched alkanes families (**Fig. 2**). The ratio of alkenes is significantly higher in animal foragers compared to other workers (Dunn-Test, $p < 0.001$, **Table S2, S3**). Conversely, the proportion of branched alkanes is significantly more abundant in builders, guardians and material foragers compared to animal foragers ($p < 0.001$, **Tables S2, S3**). Even if these analyses do not consider the proportion of mixed compounds, it is high in all colonial activities, and corresponds to around 50% of their cuticular profile (**Table S3**), including compounds P7 and P20, which are the two major compounds and represent around 40% of the total proportion (**Table S1**).

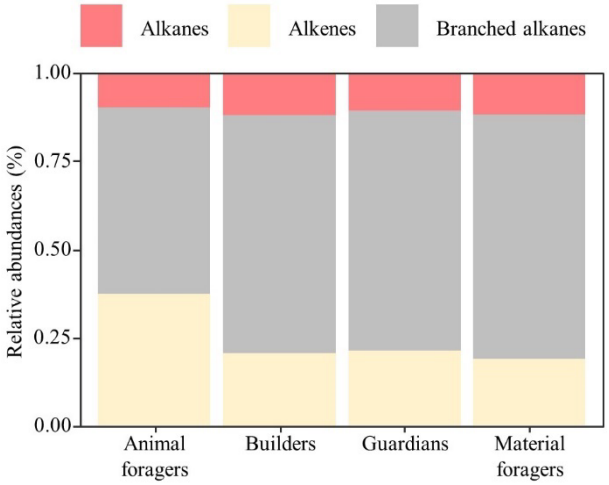


Fig. 2. Chemical signature diversity of workers. Relative abundance of cuticular hydrocarbons compounds ranked by chemical families in workers according to their activity (*i.e.* animal foragers, builders, guardians and material forager). In this figure mixed compounds were excluded and data normalized without these compounds.

Similarly, activities significantly influenced the chemical variabilities among workers for alkanes (PERMANOVA, $R^2 = 0.165$, $p = 0.05$), branched alkanes ($R^2 = 0.245$, $p = 0.001$), and alkenes ($R^2 = 0.307$, $p = 0.003$) compositions. For alkanes, animal foragers were significantly different from guardians ($p = 0.024$) but not from other workers ($p > 0.05$, **Table S4**). For alkenes and branched alkanes, animal foragers were significantly different from builders and material foragers ($p < 0.05$, **Table S4**), but not from guardians which are not significantly different from all workers ($p > 0.05$, **Table S4**) (**Fig. S2**).

The cross-model validations (2CV) in PLS-DA models shown 60.50% ± 0.73 (i, **Fig. 3A**), 36.5% ± 1.50 (ii, **Fig. 3B**) and 13.8% ± 1.3 (iii, **Fig. 3C**) of the CER. The null hypothesis that there was no difference between workers clusters was rejected for all PLS-DA models with all groups (CER = 0.597, p = 0.020), three groups (CER = 0.366, p = 0.003) and two groups (CER = 0.117, p = 0.001). In all models, animal foragers were significantly different from other workers' groups (pairwise.MVA.test, FDR adjustment method, $p < 0.05$ for all comparisons, **Table S5**). VIP scores calculated on the contribution of the 44 peaks showed that 4 alkenes (P5, P6, P18, P31), 4 branched alkanes (P34, P42, P43, P44) and 3 mixed compounds (P21, P32, P36), are common VIP and thus of major importance in the three models (**Table S1**).

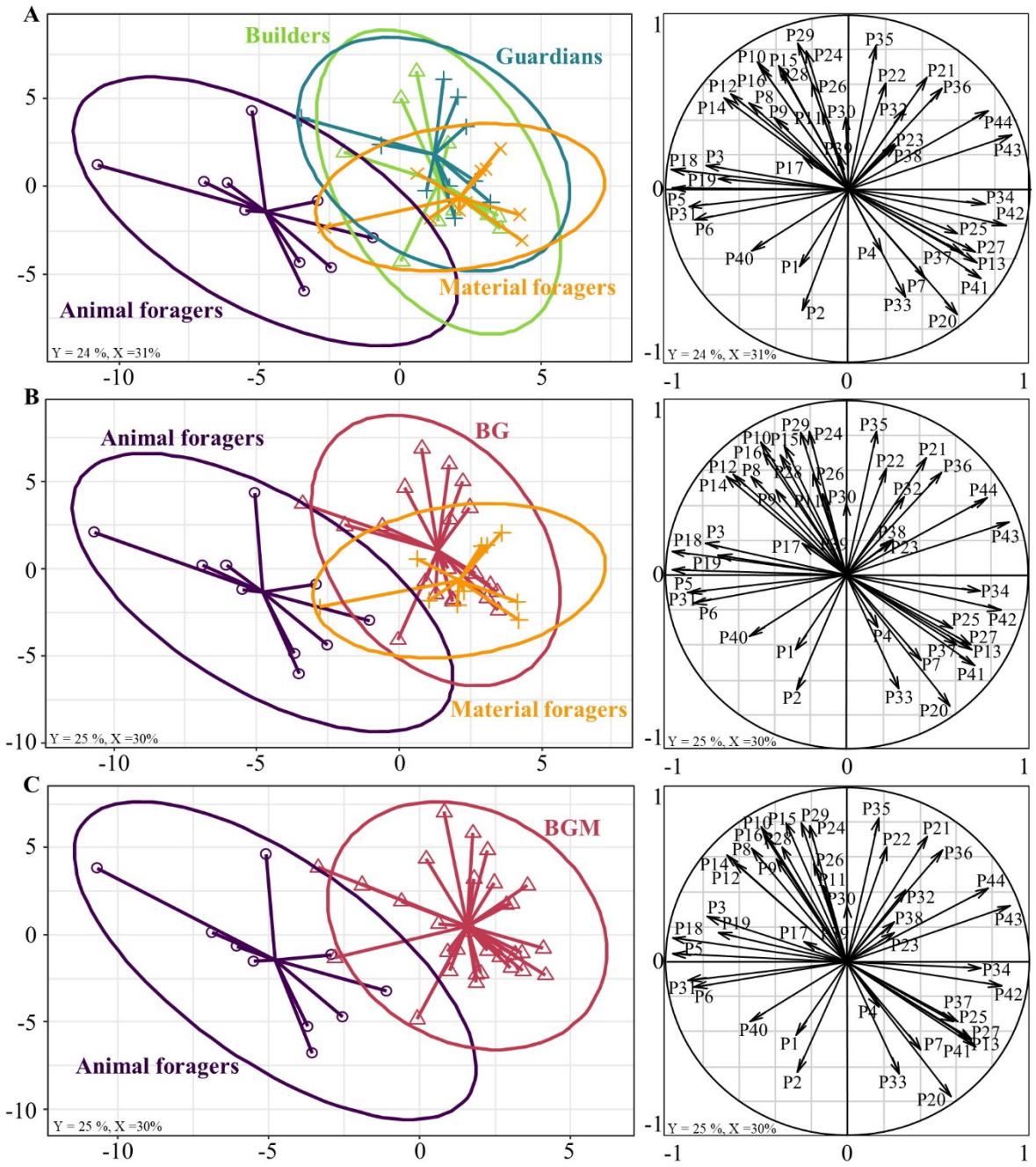


Fig. 3. Chemical separation of animal foragers. Partial Least Squares – Discriminant Analysis (PLS-DA) models and correlation circles. PLS-DA plots show discrimination between workers modalities. **A**) All activities (animal foragers, builders, guardians, material foragers) are included in the model, **B**) three activities with builders and guardians clustered together (*i.e.*, animal foragers *vs* BG *vs* material foragers) and **C**) two activities with builders, guardians and material foragers clustered together (animal foragers *vs* BGM). Ellipses represent confidences level set up at 95%. Correlation circle plots allow visualizing the discriminant compounds (see Table S1), and how they contribute to each component.

CHC's differential abundances among activities

With the last model including animal foragers and other workers clustered (BGM), 23 peaks are significantly discriminant (LEfSe, p-values < 0.05). Among them, 9 peaks of which 2 alkanes (P1, P2), 6 alkenes (P6, P40, P19, P5, P31, P18), and 1 branched alkane (P3) are biomarkers of animal foragers. For the other activities (BGM), 14 peaks of which 2 alkanes (P13, P27), 8 branched alkanes (P43, P42, P25, P34, P37, P35, P44, P38) and 4 mixed compounds (P32, P21, P36, P41) were significantly discriminant (**Fig. 4**).

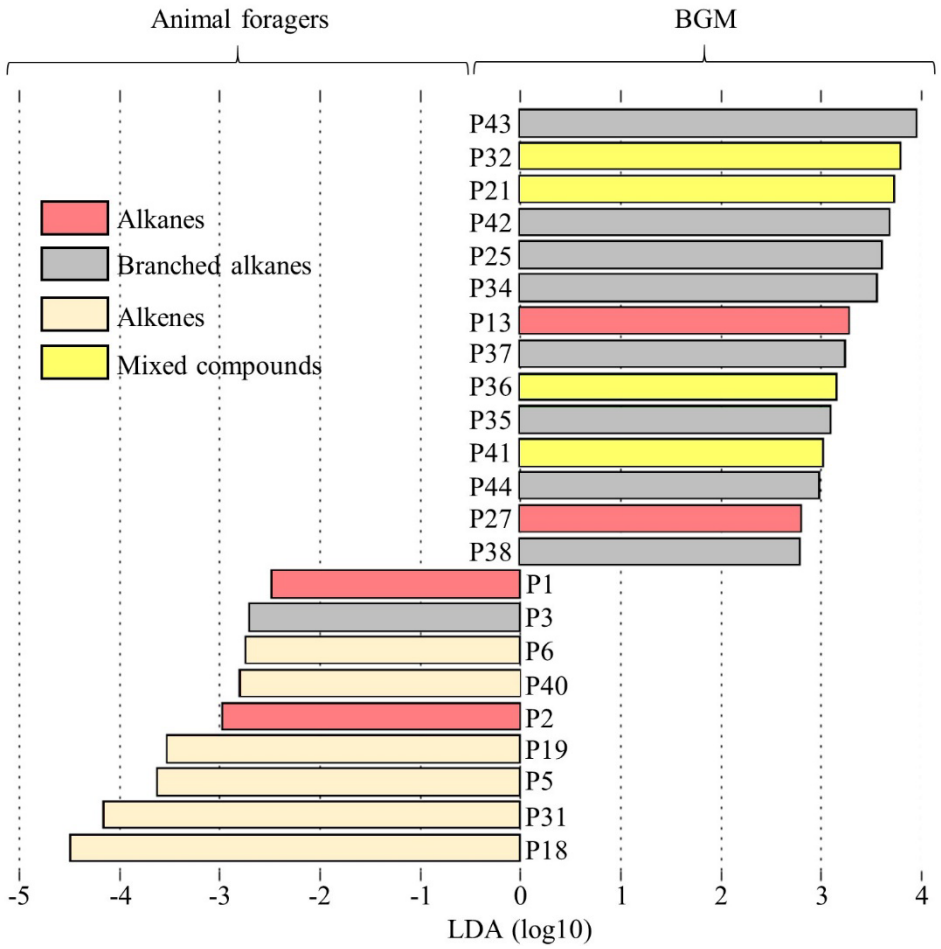


Fig. 4. Determinant chemical compounds according to activities. Discriminant peaks (LDA score (log10) > |2,5|; p < 0.05) resulting from a LEfSe. The CHCs contribution at peak level is tested between animal foragers and BGM group (builders, guardians and material foragers clustered).

Lastly, the absolute quantities of CHCs between animal foragers and BGM group is significantly different for alkenes (Kruskal-Wallis p = 0.001), but not for alkanes (p = 0.900) and branched alkanes (p = 0.211) (**Fig. 5**). Animal foragers have significantly more alkenes (0.026 mg / g hornet) than other workers clustered called BGM (0.012 mg / g hornet) (**Table S6**).

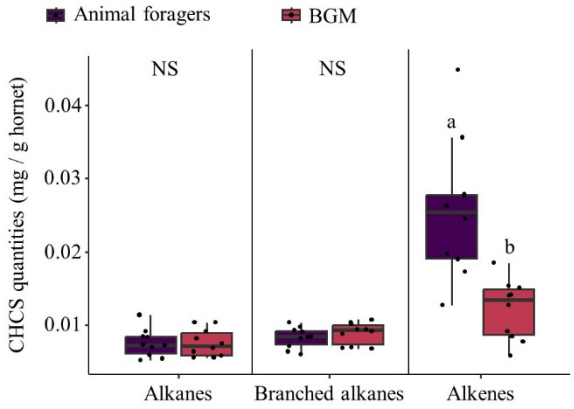


Fig. 5. Quantitative analysis of CHCs according to chemical families. Boxplots representing the absolute quantities of alkanes, alkenes and branched alkanes between *Vespa velutina nigrithorax* animal foragers and BGM (cluster of Builders-Guardians-Material foragers). Boxplots illustrate the median (middle bar) and the range between 1st and 3rd quartiles (box) with whiskers extending to the higher and lower inner values. NS = non-significant.

Discussion

In *V. velutina nigrithorax* workers, four activities have been identified and selected. Guardians which defend the nest with attack behaviours, builders which enlarge the colony, and two types of foragers which stand out according to the carrying pellets. Among them, we separate material foragers which search for vegetal material to build the nest, and animal foragers which hunt to bring back proteins in order to feed the larvae, as previously identified in wasps (O'Donnell and Jeanne 1990).

In this study, the CHCs variability among workers is explained by their colony origin as previously described (Gévar et al. 2017) but also by their activities performed. We can observe that animal foragers are clearly chemically different from guardians for alkanes

chemical composition and chemically different from builders and material foragers for alkenes and branched alkanes chemical compositions.

Alkanes are principally used to protect insects from desiccation and waterproofing (Gibbs 1998, 2002). Animal foragers, builders and material foragers performed activities outside the nest, and thus could be more affected by abiotic factors like weather factors (humidity, temperature…). This type of worker needs probably more waterproofing protection and thus a specific alkanes composition compared to guardians. When workers leave the nest, environmental factors change their chemical signature (Wagner et al. 1998, 2001) and could explain our results.

No chemical distinction between builders and material foragers have been observed in *V. velutina nigrithorax*. It is possible that material foragers are the same individuals which were considered as builders. These workers could work on the nest, with building activity, immediately after their nest material research. This phenomenon was also observed in the social wasp *Vespula Koreensis* (Kim et al. 2012) and support our hypothesis.

As the same way, no chemical distinction between guardians and other workers have been demonstrated for alkenes and branched alkanes chemical compositions. In this study, a wooden stick was agitated in front of the nest colony. It is probable that hornets captured during this experiment correspond to different types of workers, and not individuals identified as guardians. It is also possible that workers identified as guardians do not need specific chemical cues concerning their alkenes and branched alkanes chemical compositions.

However, the alkenes proportion on animal foragers is greater than other workers. Conversely, their branched alkanes proportion is lower than others. Alkenes are important cues for nestmate recognition (Dani et al. 2001). Their higher proportion could be considered as a specific chemical signal corresponding to their activity. Branched alkanes are used for recognition processes (Dani et al. 2001; Lucas et al. 2004; Blomquist and Ginzel 2021).

Acquiring the smells that enable to be recognised by members of the colony is necessary to avoid being rejected by them (Hefetz 2007). Considering that builders, guardians and material foragers spend more time near or inside the colony than animal foragers, their branched alkanes proportion could be higher and therefore explain our results. The Gestalt model suggest that nestmates exchange their CHCs to maintain a uniform colonial odour (Crozier and Dix 1979). Because they spend less time in the colony, branched alkanes exchanges could be less important in animal foragers compared to other workers, but behavioural experiments are necessary to confirm this point.

No clear chemical distinction between builders, guardians and material foragers have been demonstrated. It is therefore possible that these activities do not require specific chemical cues or that they are carried out by the same workers. In wasps *Polybia aequatorialis*, task exchange between food and nest material foragers was rare (O'Donnell and Jeanne 1990). Further studies could follow these workers during a long period in order to determine if they can switch between activities for example according to their age.

Our main result shows that *V. velutina nigrithorax* workers present two different chemical groups, the animal foragers and the others.

The alkenes amount is higher in animal foragers compared to other workers clustered (BGM). As previously explained, alkenes are used for nestmate recognition (Dani et al. 2001). In this type of forager, this strong chemical signal could be specific to their activity performed. In wasps *Polybia aequatorialis*, a task specialisation among foragers have been identified (O'Donnell and Jeanne 1990). This task specialisation among foragers is also present in *V. velutina nigrothorax*.

In the social wasps *Vespula Koreensis*, prey foragers are oldest than pulp foragers (Kim et al. 2012). Therefore, our results suggest a chemical task specialisation and a potential

temporal polyethism. Animal foragers would take more risks to forage food outside from the nest, as previously found in the wasp *Polybia aequatorialis* (O'Donnell and Jeanne 1992) and could be considered as older workers. In fact, it has been considered that temporal polyethism is an adaptative behaviour where young workers performed low cost task contrary to older ones (Goldsby et al. 2012). For example, in honey bees, workers present an age-related division of labour. They start by nursing and food using, inside the hive, then at a later stage by foraging outside the nest (Robinson 1992; Smith et al. 2008; Søvik et al. 2015). Workers foraging outside are chemically different from others which performed tasks within the hive (Vernier et al. 2019). In this study, controlling the age of individuals under natural conditions or keeping hornets alive without affecting their social behaviours in laboratory or in the field seems difficult. This limit in our study, concerning a potential age polyethism, is important, but it would be interesting to remedy it to test our hypothesis. Future studies are therefore necessary. Other parameters could also explain the chemical separation between workers, such as hormonal regulation (Lengyel et al. 2007). Authors demonstrated in honeybees workers, that CHCs modification occurs through environmentally sensitive changes in intrinsic biosynthetic pathways. Vernier et al. (2019) showed that the chemical signature of workers is regulated by innate developmental processes associated with age, division of labour and by social environment. A chemical distinction between workers inside the hive and foragers have been demonstrated and associated with transcriptional changes in CHC biosynthetic pathway gene.

Lastly, in this study, we determined some CHCs which could be discriminative to some activities, where some of them could give some particular information to conspecifics.

A total of 9 CHCs discriminate animal foragers. Among them, the 3Me-C23 is considered as an age indicator in the Diptera *Calliphora* (Moore et al. 2016). This compound could be related with animal forager behaviour in *V. velutina nigrithorax,* if such foragers are the oldest workers. As such, we cannot exclude that our significant effect might be due to the age of the worker

and might covary with their associated activity. All alkenes are chemically discriminant of animal foragers. These CHCs which are of great importance in nestmate recognition could be used as a chemical signal specific of their activity.

In BGM workers, a total of 14 CHCs are discriminants. Among them, the 3-MeC27 have been found in wasps newly emerged individuals (Kühbandner et al. 2013). As previously suggested in *V. velutina nigrithorax*, builders, guardians and material foragers could be consequently younger than animal foragers. The presence of this compound particularly in such workers could support this hypothesis (Goldsby et al. 2012).

In this study, the proportion of mixed compounds is high relative to the overall CHCs composition. This high proportion is explained by compounds P7 and P20 which are the most important compounds in the cuticular profile of all workers. However, despite their significant proportion, these mixed compounds are not of major interest in different models contrary to P21, P32, P36 and P41 which some of them are of a great contribution in PLS-DA models, and all are chemical discriminants for BGM group. These mixed compounds constitute a limit in our study and could explain more precisely chemical cues used by these workers.

Supplementary materials

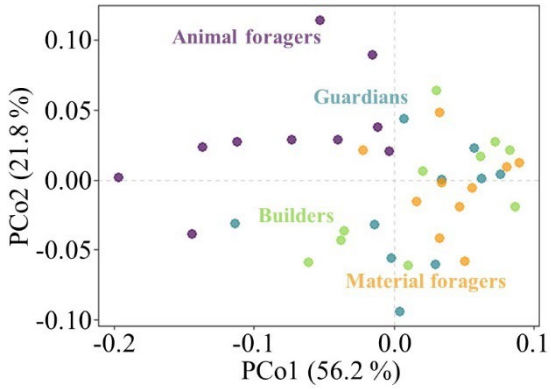


Fig. S1. Principal Coordinate Analysis Principal (PCoA) plot of the total chemical signature. PCoA plot illustrating the Bray-Curtis dissimilarities between pairs of *Vespa velutina nigrithorax* chemical cues. The chemical cues are coloured according to the activity of workers.

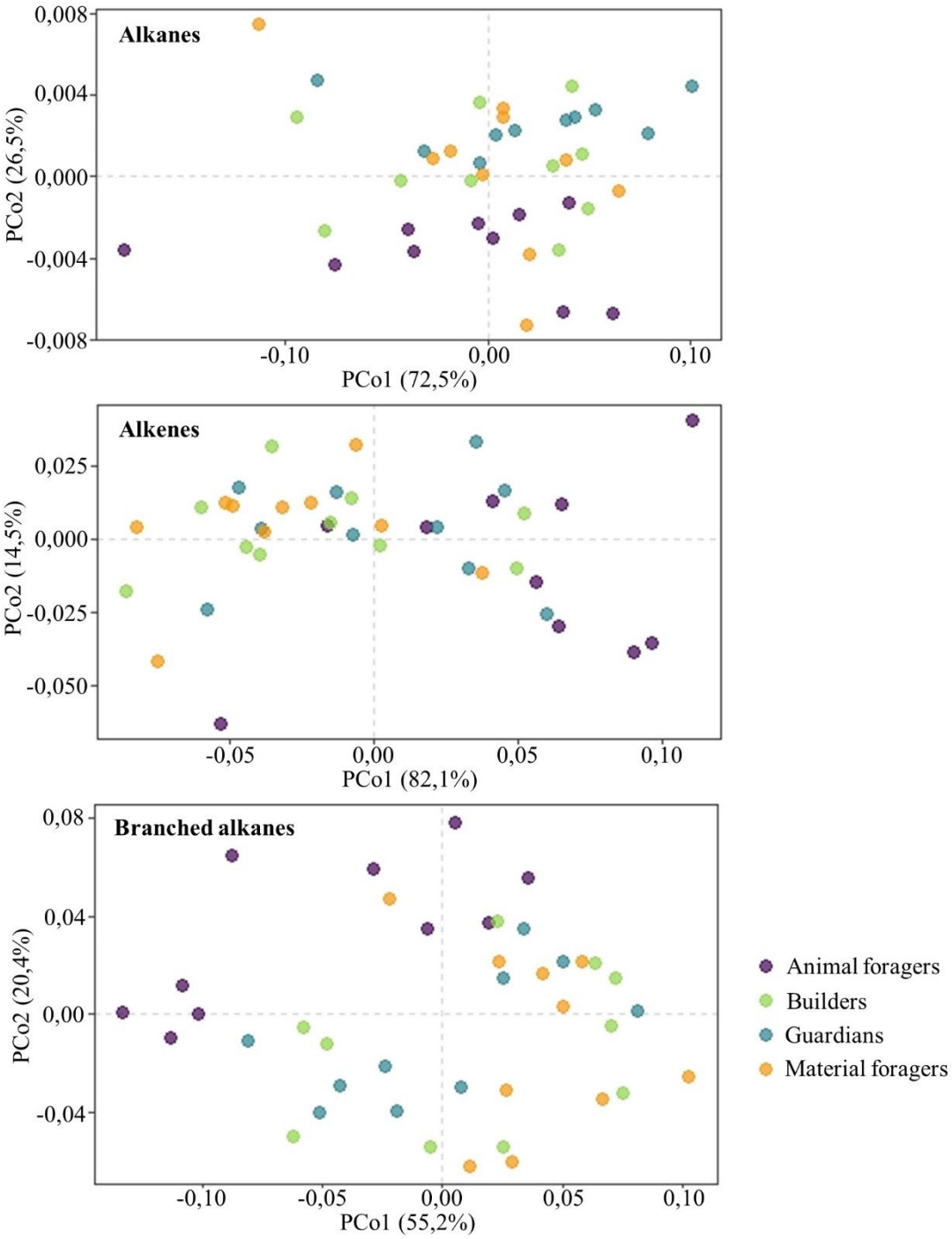


Fig. S2. Principal Coordinate Analysis Principal (PCoA) plots of alkanes, alkenes and branched alkanes. PCoA plots illustrating the Bray-Curtis dissimilarities between pairs of *Vespa velutina nigrithorax* chemical cues for alkanes, alkenes and branched alkanes. The chemical cues are coloured according to the workers' activity.

Table S1. Cuticular hydrocarbons of *Vespa velutina nigrithorax* workers. VIP: calculated Variable Importance in the Projection. * corresponds to the in the first model (animal foragers, builders, guardians, material foragers), ⧫ corresponds to the VIP of the second model (animal foragers, BG, material foragers) and ¤ corresponds to the VIP of the third model (animal foragers, BGM). The percentages are represented for each activity (Means ± SE), *i.e.* animal foragers, builders, guardians and material foragers.

Chemical compound	Peak	Retention time	VIP score	Animal foragers %	Builders %	Guardians %	Material foragers %
n-C21	1	24.58	*	0.072 ± 0.019	0.048 ± 0.018	0.028 ± 0.004	0.037 ± 0.006
n-C23	2	27.61	*	0.780 ± 0.067	0.646 ± 0.060	0.489 ± 0.035	0.653 ± 0.061
3-MeC23	3	28.71	⧫¤	0.040 ± 0.009	0.021 ± 0.002	0.020 ± 0.002	0.021 ± 0.003
n-C24 + unknown	4	29.12		0.265 ± 0.018	0.281 ± 0.017	0.259 ± 0.010	0.288 ± 0.015
X-C25:1	5	30.24	*⧫¤	1.119 ± 0.115	0.339 ± 0.053	0.358 ± 0.082	0.300 ± 0.049
X'- C25:1	6	30.35	*⧫¤	0.112 ± 0.018	0.036 ± 0.004	0.038 ± 0.006	0.033 ± 0.005
n-C25 + unknown	7	30.6		14.426 ± 0.749	15.329 ± 0.622	14.909 ± 0.468	15.468 ± 0.400
11 + 13-MeC25	8	31.1		0.893 ± 0.121	0.796 ± 0.087	0.747 ± 0.067	0.750 ± 0.065
7-MeC25	9	31.2	*⧫	0.112 ± 0.015	0.109 ± 0.009	0.097 ± 0.005	0.103 ± 0.006
5-MeC25	10	31.33		0.403± 0.032	0.368 ± 0.024	0.394 ± 0.022	0.352± 0.014
3-MeC25 + X-C26:1	11	31.66		2.717 ± 0.186	2.666 ± 0.182	2.825 ± 0.212	2.590± 0.159
X,X'-diMeC25	12	31.81		0.178 ± 0.035	0.116 ± 0.020	0.135 ± 0.018	0.097 ± 0.011
n-C26	13	32.05		1.718 ± 0.123	2.043± 0.098	2.033 ± 0.093	2.088 ± 0.054
X'',X'''-di-MeC25	14	32.15		0.201 ± 0.031	0.153 ± 0.020	0.160 ± 0.014	0.137 ± 0.015
13-,11-,9-,7-MeC26	15	32.53		0.305± 0.032	0.306 ± 0.029	0.295 ± 0.020	0.281 ± 0.016
6-MeC26	16	32.7		0.041 ± 0.005	0.037 ± 0.004	0.041 ± 0.003	0.035 ± 0.002
4-MeC26	17	32.90		0.242 ± 0.093	0.166 ± 0.016	0.192 ± 0.019	0.153 ± 0.011
X-C27:1 + X'-C27:1	18	33.14	*⧫¤	11.168 ± 0.838	5.411 ± 0.639	5.699 ± 0.760	4.677 ± 0.492
X"-C27:1	19	33.23	¤	1.111 ± 0.315	0.508 ± 0.040	0.518 ± 0.032	0.454 ± 0.025
n-C27 + X-MeC27:1	20	33.49		18.814 ± 0.940	20.157 ± 0.895	20.000 ± 0.837	20.929 ± 0.429
X-MeC27:1 + 13-,11-,9-MeC27	21	33.94	*⧫¤	6.315 ± 0.262	7.490 ± 0.330	7.377 ± 0.268	7.316 ± 0.272
7-MeC27	22	34.03	*⧫	1.195 ± 0.059	1.341 ± 0.057	1.331 ± 0.049	1.295 ± 0.040
5-MeC27	23	34.15		0.790 ± 0.034	0.835 ± 0.034	0.889 ± 0.034	0.822 ± 0.033

11-,15-,9-,X-diMeC27	24	34.3		2.453 ± 0.256	2.465 ± 0.238	2.644 ± 0.233	2.157 ± 0.144
3-MeC27	25	34.49	*	7.824 ± 0.280	8.363 ± 0.325	8.668 ± 0.325	8.764 ± 0.241
5-,15-diMeC27 + 2-,13-diMeC27 + 2-,15-diMeC27	26	34.59	*	0.932 ± 0.062	0.869 ± 0.051	0.982 ± 0.047	0.890 ± 0.027
n-C28	27	34.82	¤	0.539 ± 0.028	0.625 ± 0.022	0.625 ± 0.025	0.631 ± 0.021
X,X'-diMeC27 + X''-MeC28	28	34.94		1.968 ± 0.163	1.832 ± 0.146	2.064 ± 0.130	1.708 ± 0.086
X,X'-di-MeC28 + X''-,X'''-di-MeC28	29	35.28		0.902 ± 0.062	0.897 ± 0.062	0.956 ± 0.049	0.842 ± 0.027
5-,4/2-MeC28	30	35.62	*♦	0.293 ± 0.017	0.317 ± 0.023	0.327 ± 0.019	0.288 ± 0.008
X-C29:1	31	35.87	*♦¤	6.434 ± 0.436	3.751 ± 0.317	3.787 ± 0.416	3.481 ± 0.304
X'-C29:1 + unknown	32	35.99	*♦¤	1.690 ± 0.250	2.831 ± 0.399	3.232 ± 0.434	2.828 ± 0.317
n-C29	33	36.16		2.266 ± 0.294	2.472 ± 0.211	2.237 ± 0.172	2.501 ± 0.188
13-,11-,9-,7-MeC29	34	36.60	*♦¤	2.185 ± 0.117	2.933 ± 0.170	2.677 ± 0.135	2.994 ± 0.127
5-MeC29 + 11-,15-diMeC29	35	36.93		2.269 ± 0.088	2.520 ± 0.133	2.611 ± 0.125	2.500 ± 0.078
X-C30:1 + 9-,15-diMeC29	36	37.01	*♦¤	0.793 ± 0.057	1.044 ± 0.064	1.034 ± 0.048	1.111 ± 0.083
3-MeC29	37	37.12	*♦	0.712 ± 0.078	0.933 ± 0.081	0.874 ± 0.052	1.283 ± 0.137
X,X'-diMeC29	38	37.22	*♦	0.548 ± 0.055	0.615 ± 0.045	0.654 ± 0.045	0.690 ± 0.046
X",X'"-diMeC29	39	37.53		0.668 ± 0.074	0.642 ± 0.036	0.707 ± 0.044	0.675 ± 0.051
X-C31:1	40	38.48	*¤	0.487 ± 0.036	0.368 ± 0.029	0.371 ± 0.032	0.388 ± 0.023
Unknown	41	38.71	♦¤	0.314 ± 0.034	0.497 ± 0.052	0.447 ± 0.044	0.535 ± 0.050
11-MeC31	42	39.09	*♦¤	0.949 ± 0.101	1.901 ± 0.163	1.609 ± 0.134	2.043 ± 0.149
X,X'-diMeC31	43	39.46	*♦¤	2.482 ± 0.142	4.115 ± 0.167	4.195 ± 0.169	4.383 ± 0.238
X'',X'''-diMeC31	44	39.68	*♦¤	0.274 ± 0.015	0.448 ± 0.021	0.466 ± 0.031	0.429 ± 0.030

Table S2. P-values obtained by pairwise comparisons using Dunn-Test with Bonferroni correction. Significant results are in **bold** ($p < 0.05$).

		Animal foragers	Material foragers	Guardians
Alkenes	Material foragers	**< 0.001**	-	-
	Guardians	**0.004**	1.000	-
	Builders	**0.003**	1.000	1.000
Branched alkanes	Material foragers	**0.001**	-	-
	Guardians	**0.002**	1.000	-
	Builders	**0.006**	1.000	1.000

Table S3. Relative abundance of each hydrocarbon family for each activity (means ± SE).

	Animal foragers	Builders	Guardians	Material foragers
Alkanes	5.375% ± 0.419	5.834% ± 0.320	5.412% ± 0.269	5.910% ± 0.198
Alkenes	20.431% ± 1.495	10.413% ± 1.015	10.771% ± 1.262	9.333% ± 0.841
Branched alkanes	28.859% ± 0.567	33.099% ± 0.729	33.732% ± 0.655	33.693% ± 0.616
Mixed compounds	45.335% ± 1.456	50.655% ± 1.011	50.085% ± 1.039	51.064% ± 0.630

Table S4. P-values obtained by pairwise adonis comparisons, using the Permanova tests between workers activities. **Bold** values are statistically significant ($p < 0.05$).

		Animal foragers	Material foragers	Guardians
Alkanes	Material foragers	0.708	-	-
	Guardians	**0.024**	1.000	-
	Builders	0.786	1.000	1.000
Alkenes	Material foragers	**0.006**	-	-
	Guardians	0.132	0.402	-
	Builders	**0.036**	1.000	1.000
Branched alkanes	Material foragers	**0.006**	-	-
	Guardians	0.090	0.438	-
	Builders	**0.030**	1.000	1.000

Table S5. Workers activities cross-tabulations, showing all pairwise differences of sum relative abundance among tasks for each PLSDA model. P-values (adjusted by the False Discovery Rate) obtained by pairwise comparisons using factor fitting to an ordination. First model (i) with all worker's activities (builders *vs* guardians *vs* animal foragers *vs* material foragers), second model (ii) with three activities with builders and guardians clustered (*i.e.,* animal foragers *vs* BG *vs* material foragers) and last model (iii) with two activities with builders, guardians and material foragers clustered (*i.e.,* animal foragers *vs* BGM). **Bold** values are statistically significant ($p < 0.05$).

		Animal foragers	Material foragers	Guardians
(i)	Material foragers	**0.006**	-	-
	Guardians	**0.009**	0.937	-
	Builders	**0.006**	0.937	0.173
(ii)	Material foragers	**0.003**	-	-
	BG	**0.007**	0.317	-
(iii)	BGM	**0.001**	-	-

Table S6. Absolute quantities of each hydrocarbon family for animal foragers and BGM group (builders, guardians and material foragers clustered) (means ± SE).

	Alkanes	Alkenes	Branched alkanes
Animal foragers	0.008 ± 0.001	0.026 ± 0.004	0.008 ± 0.001
BGM	0.008 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.009 ± 0.000

Partie 2 : La phéromone d'alarme

A colonial signature of the alarm pheromone and chemical differences between workers in the Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*

In preparation as: Haouzi M., Bastin F., Perdereau E., Beaugeard L., and Darrouzet E. A colonial signature of the alarm pheromone and chemical differences between workers in the Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*.

Abstract

In eusocial insects, their social organisation is based essentially on the emission of pheromones. Among chemical compounds, the alarm pheromone is an essential component of colonial survival by inducing nestmates recruitment and defensive behaviours. In this study, we analysed the alarm pheromone composition in the invasive Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* workers, (1) from different colonies and (2) according to their activities. Our results showed a strong colonial signature of this pheromone, and chemical variability among workers performing different activities, suggesting a chemical task specialization in workers. Two types of workers are chemically different, where animal foragers and builders exhibit discriminant pheromones that could transmit specific signals. Our results suggest that the alarm pheromone could be used as recognition signal in Vespidae, but could also linked to a phenomenon of task specialization in hornets.

Key words: venom gland, division of labour, task, Asian hornet, Vespidae

Introduction

In insects' societies, chemical signals are essential cues to mediate various behaviours participating in the social organisation of individuals (Yew and Chung 2015). To improve colony efficiency, the division of labour allows workers to specialize in a subset of tasks such as brood care, nest maintenance and foraging (Wilson 1971; Duarte et al. 2011). This behavioural plasticity can be modulated by biotic (morphology, genetic variation, ontogeny) or

abiotic factors (diet, life experience, chemical stimulation) (Duarte et al. 2011), but also by biochemical pathways such as pheromone emissions (Wyatt 2003b). In fact, pheromones are known to regulate colonial behaviour in honeybees (Slessor et al. 2005), wasps (Bruschini et al. 2010), ants (Hölldobler 1995) or termites (Wen et al. 2014), for example.

In social insects, alarm pheromones are made up of a mixture of compounds (Hölldobler 1995; Bruschini et al. 2010; Wen et al. 2014). These pheromones can be stored in a reservoir gland, which can be used as a chemical source to trigger social behaviour (Blum 1969). In some species, the venom gland has been highlighted as an alarm pheromones source (Wang et al. 2016; Cheng et al. 2017) and the alarm signal is release simultaneously with venom (Jeanne 1981). A chemical compound is considered as an alarm pheromone if the chemical signal is release under danger exposition, it is perceived by nestmates and it induces behavioural changes following exposure (Verheggen et al. 2010). With their high volatility, these chemical compounds are essential mediators for colonial survival. When colonies are threatened, these compounds are used to trigger nestmates recruitment and defensive behaviours (Boch and Shearer 1971; Bruschini et al. 2008b). Some alarm compounds have been identified to elicit alarm behaviours in different species. In *Vespula squamosa*, the N-3methylbutylacetamide have been identified to induce attack responses (Heath and Landolt 1988). In honey bees, the isopentyl acetate provokes a rapid defensive response (Alaux and Robinson 2007). It is also possible, that some compounds of alarm pheromone play a role in behaviour when they act in synergy. It is the case in *Vespa velutina auraria*, where hornets respond by an attack behaviour after exposure to ketones fraction from the venom gland (Cheng et al. 2017). However, some compounds are less volatile in order to transmit durable informations. For example, in bees, these compounds can be used as heterospecific alarm signals by workers at food sources to signal a danger (Schorkopf et al. 2009; Li et al. 2014; Wang et al. 2016).

In this study, we focused on the hornet alarm pheromone. Native to the southeast Asia (Arca et al. 2015), the Yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax*, was accidentally introduced into southwest France, around 2004 (Haxaire et al. 2006). It then rapidly invaded many Western Europe countries (Robinet et al. 2018), which induced negative impacts on entomofauna (Rome et al. 2021), and especially in honeybee populations (Requier et al. 2018, 2019; Leza et al. 2019), causing important economic losses (Laurino et al. 2019; Requier et al. 2023) and public human health problems (Beggs et al. 2011; Laborde-Castérot et al. 2021). Few studies have investigated the alarm pheromone in genus *Vespa*. First, it has been shown that *Vespa velutina* use the sting venom as an alarm pheromone (Cheng et al. 2017). In two previous studies, one on the native population *V. velutina auraria* (Cheng et al. 2017), and the other one on the European invasive population *V. velutina nigrithorax* (Thiéry et al. 2018), some alarm compounds from the venom gland were identified. In these both studies, these compounds were tested when colonies were threatened and elicited defensive behaviours. Three other studies have also analysed the alarm pheromone composition between female castes, and found new compounds. However, in these studies, chemical extraction methods and castes analysis were different. One of them, analysed the *in vivo* composition of the alarm pheromone in living individuals using a headspace device, as well as, the *in vitro* composition produced by the venom apparatus in workers and queens (Rodríguez-Flores et al. 2021b). A second study analysed the venom reservoir composition between workers and gynes with headspace Solid Phase Micro-Extraction (SPME) (Cappa et al. 2019). The last, analysed the venom gland composition between workers, gynes, foundresses and queens, with liquid and SPME extractions. Currently, a total of 35 compounds have been found in the alarm pheromone of *Vespa velutina* species and a caste differentiation has been highlighted, thus suggesting that this pheromone is dynamic through the life cycle of fertile females (Berville et al. 2023).

In *V. velutina nigrithorax* workers, some social behaviours have been identified, such as nest maintenance, nest patrolling and foraging (Monceau et al. 2017). Among workers, four activities have been identified in a previous study, (*i.e.,* animal foragers, builders, guardians and material foragers) and correlated with their cuticular profiles, where animal foragers were clearly chemically separated from others, therefore suggesting a chemical task specialization (Haouzi et al. in prep, **Chapitre 3**). To feed larvae, *V. velutina nigrithorax* is a generalist scavenger and insects predator which transform preys into pellet, before to get back to the colony (Matsuura and Yamane 1990; Rome et al. 2021). These workers which go in search of food are considered as animal foragers. Concerning other activities, builders correspond to workers which enlarge the colony, guardians to workers which defend the nest when they were stressed, and material foragers to workers which get back to the colony with a vegetal pellet containing a mix of vegetal fibers and saliva.

Because the alarm pheromone can be a source of specific information important in the organisation of insect societies, it could be different according to some factors as the nature of individuals which produce it for example. This study aimed to analyses both the venom gland composition of workers according to (1) their activity they performed, and (2) their colonial origin. We hypothesized that chemical variability between workers will be explained by their activity, but also by their colony origin, suggesting that alarm pheromone could be used as recognition signal in Vespidae and used by workers to encode different information.

Materials and Methods

Hornet sampling

In front of 9 colonies in France, 148 *Vespa velutina nigrithorax* workers were collected according to their activities performed from mid-August to mid-October 2021 (**Fig. 1**).

Hornet workers were identified following their activities and captured as previously described (Haouzi et al. in prep, **Chapitre 3**). Fours workers type were distinguished: animal foragers, builders, guardians, and material foragers. For each type, four individuals were collected in each nest, except for Amboise (animal forager, n = 5; guardian, n = 3; material forager, n= 3), Ballan-miré (animal forager, n = 6), Saint Cyr sur Loire (material forager, n = 5), Saint-épain (material forager, n = 5) and Villedieu-les-Poêles (material forager, n = 5).

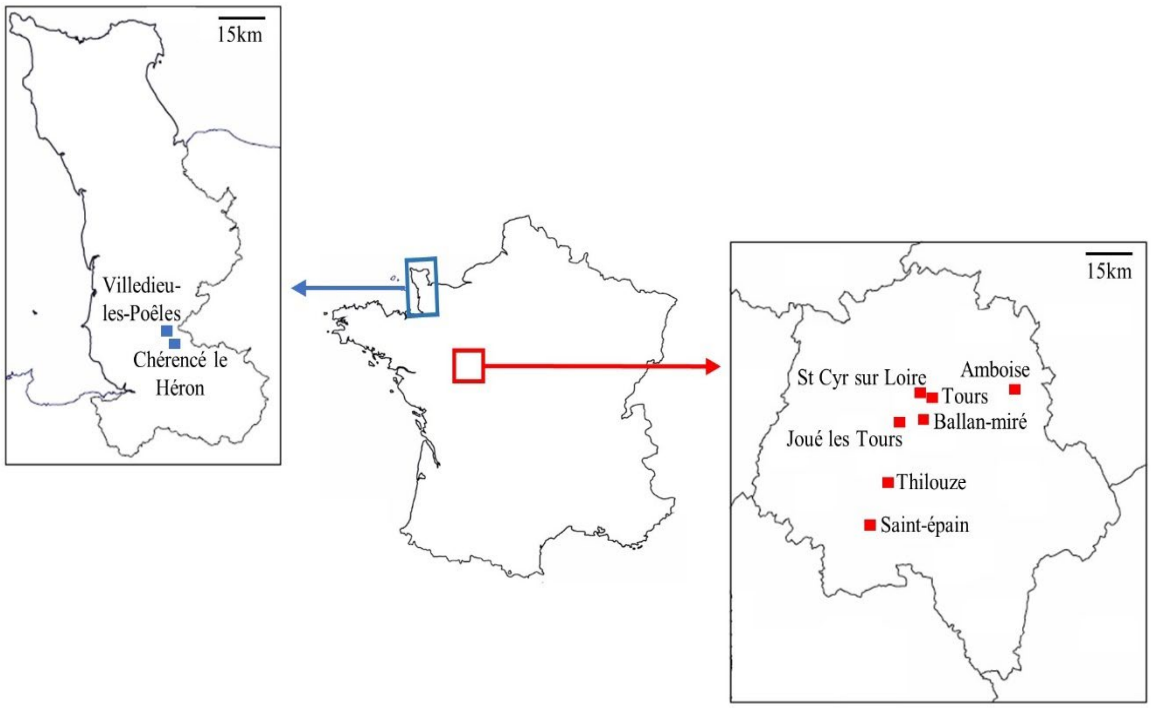


Fig. 1. Cartography of hornets sampling in France. Nests from the department of La Manche are colored in blue, and nests from Indre et Loire are colored in red.

Venom gland composition analyses

Workers for each activity were frozen killed at -20°C, until they could be dissected under a binocular microscope. For each worker, the venom gland was placed in a glass vial with 200 µl of heptane and stored at -20°C. Immediately before analyses, glands were perforated, 0.5 µl of *n*-eicosane (10^{-3} g/ml) was added to each sample as an internal standard and vials were vortexed at 300 rpm for 1 min. Two µl of each chemical sample was analysed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC 7890B – MS 7000C Triple Quad, Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA). Extracts were injected in the GC injector with a splitless time of 2 min at a constant temperature of 250°C. Helium was the carrier gas (flow rate=1.2 ml/min) and the GC was equipped with a Zebron ZB-5HT column (30m L x 0.25mm ID x 0.25 µm df; 5% Phenyl - 95% Dimethylpolysiloxane, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The conditions were 70 eV electron impact ionization. The oven temperature program was used with first an initial temperature ramp from 50°C to 200°C at 8 °C/min, a second temperature ramp from 200°C to 315°C at 5°C/min, and a 5-min final hold at 315°C. Data were analysed with MassHunter Qualitative Analysis (v. 10.2, Agilent) and AMDIS v. 2.0g, NIST 2017 softwares. Compounds were identified based on fragmentation patterns of their mass spectra (McLafferty F and Turecek F 1993) and assigned according to previous *V. velutina nigrithorax* spectra published (Berville et al. 2023). Peaks integration was carried out using the MassHunter Quantitative Analysis software (v. 10.2, Agilent technology).

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using R software (R v4.1.0). The relative abundance of chemical compounds by chemical sample was calculated by dividing each area peak by the sum of the areas' peaks.

To test the influence of both colonial origin and activity on the chemical signature of workers, Permutational Analysis of Variance (PERMANOVA, n = 999 permutations) were performed on the Bray-Curtis dissimilarity matrices calculated with the relative abundance of chemical molecules between each pair of samples. The adonis2 function from the vegan package (v2.6-2) was used (Oksanen et al. 2022). First, the interaction between colonial origin and activity variables was tested. Because an interaction has been highlighted, PERMANOVA tests were performed on the effect of colonial origin with the activity variable entered as stratification variable; and inversely for the effect of activity, where the colonial origin variable

was entered as stratification variable. When significative effects were observed, pairwise comparisons were carried out using the pairwise.adonis2 function from the pairwiseAdonis package (v0.4) (Martinez Arbizu 2017). A two-dimensional Principal Coordinate Analysis (PCoA) was performed to illustrate the chemical composition dissimilarities between samples, using the ape package (v5.6-2) (Paradis and Schliep 2019).

Then, the LEfSe algorithm was used to identify chemical biomarkers of animal foragers, builders and other worker types (*i.e,* guardians and material foragers clustered and called GM). The first analysis step was a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) sum-rank test indicating the significant differential abundance of workers activities. Afterwards, chemical consistency was investigated using a pairwise Wilcoxon test. Finally, Linear Discriminant Analysis (LDA) was used to estimate the effect chemical compounds according to activities. Alpha values of 0.05 were performed for Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests, and a threshold of 2 was used for logarithmic LDA scores.

Results

Seventeen compounds with chain lengths ranging from 9 to 11 carbons have been found in chemical profiles of the venom glands in workers (**Table 1**). Among them, 8 were ketones, 4 esters, 2 alcohols and 3 unknown compounds.

Table 1. Chemical compounds from venom gland of *Vespa velutina nigrithorax* workers. The relative abundances are represented for each activity (Means ± SE), *i.e.* animal foragers, builders, guardians and material foragers.

Peak	Chemical compounds	Animal foragers	Builders	Guardians	Material foragers
1	Nonan-2-one	5.245 ± 0.855	2.417 ± 0.723	4.152 ± 1.005	4.012 ± 0.945
2	Nonan-2-ol	1.377 ± 0.127	1.016 ± 0.192	1.432 ± 0.184	1.417 ± 0.189
3	Isoamyl isovalerate	9.280 ± 1.955	22.394± 2.611	15.576 ± 2.744	17.615 ± 3.189
4	Cyclohexanol	4.386 ± 0.386	2.506 ± 0.415	3.102 ± 0.420	3.551 ± 0.520
5	X-C12:1 + 4,8-diMe-1,7-nonadiene	1.794 ± 0.481	4.454 ± 0.720	2.861 ± 0.616	2.922 ± 0.684
6	Unknown 1	2.432 ± 0.240	1.696 ± 0.314	2.04 ± 0.289	1.593 ± 0.320
7	4,8-diMe-7-nonen-2-one	23.139 ± 1.995	10.024 ± 1.633	15.674 ± 1.960	16.940 ± 2.057
8	2-Nonanyl, 2-acetate	3.000 ± 0.306	3.059 ± 0.578	3.237 ± 0.438	3.667 ± 0.468
9	B-Citronellol, methyl ether	1.871 ± 0.220	0.850 ± 0.212	1.330 ± 0.220	1.341 ± 0.223
10	X'-Undecen-2-one	3.240 ± 0.417	1.741 ± 0.431	2.860 ± 0.514	3.146 ± 0.493
11	X-Undecen-6-one	10.657 ± 1.706	11.590 ± 1.063	9.226 ± 0.973	11.027 ± 1.137
12	Undecan-2-one	6.826 ± 0.716	4.835 ± 0.733	7.220 ± 0.872	6.979 ± 0.765
13	Unknown 2	13.915 ± 1.494	10.382 ± 1.485	10.242 ± 1.151	9.042 ± 1.124
14	Decane-2,9-dione + unknown 3	3.636 ± 0.884	11.510 ± 1.800	7.957± 1.497	5.227 ± 0.911
15	Unknown 4	1.899 ± 0.325	4.277 ± 1.045	6.941 ± 2.881	6.074 ± 2.570
16	X-Undecene-2,10-dione	5.556 ± 0.719	4.789 ± 0.703	4.302 ± 0.688	3.945 ± 0.632
17	Undecane-2,10-dione	1.747 ± 0.299	2.460 ± 0.432	1.851 ± 0.342	0.221

Effects of colonials' origin and activities on the venom gland composition

The interaction between colonial origin and activity variables was significative (PERMANOVA, $R^2 = 0.143$, $p = 0.029$). When variables were tested independently, both colonial origin and activity significantly influenced the variability in the chemical compositions of the venom gland among workers and explaining respectively 30% (PERMANOVA, $R^2 = 0.304$, $p = 0.001$) and 8% (PERMANOVA, $R^2 = 0.078$, $p = 0.001$) of the variance in the

chemical composition. The ordination of the different workers types in a two-dimensional PCoA showed a clear separation between some colonies, but also between animal foragers and other activities (**Fig. 2**). Compared in pairs, animal foragers are significantly different from builders ($p = 0.001$), guardians ($p = 0.006$), and material foragers ($p = 0.003$). Builders are both significantly different from guardians ($p = 0.009$) and material foragers ($p = 0.003$). Conversely, guardians are not significantly different from material foragers ($p = 0.759$). For colonies, most of them are significantly different from each other's ($p < 0.05$) (**Table S1**).

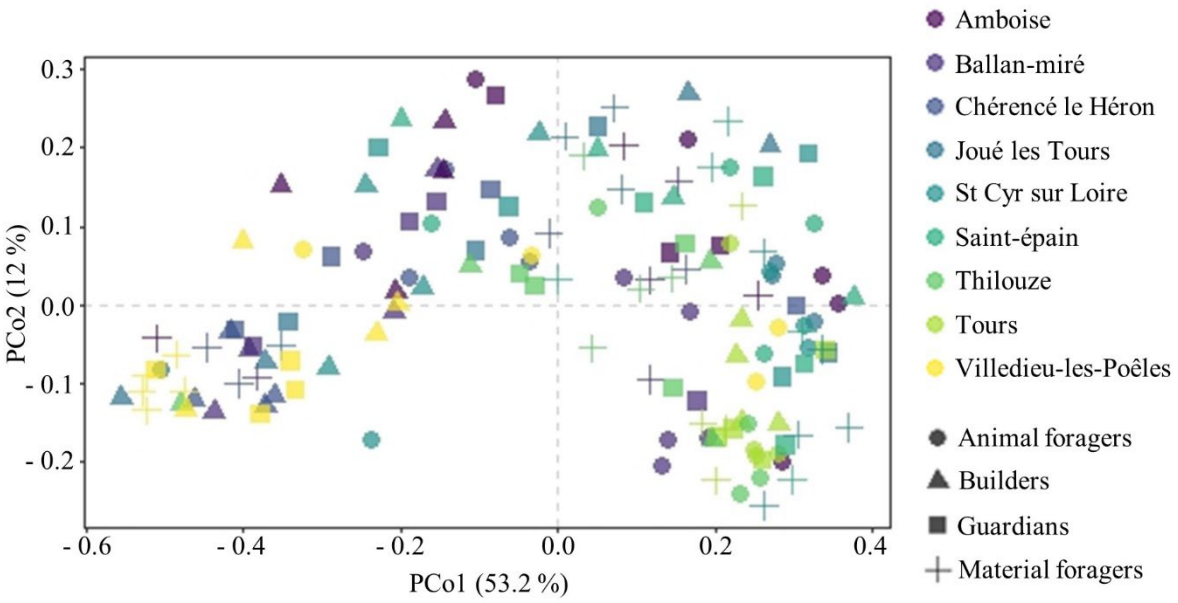


Fig. 2. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot illustrating the Bray-Curtis dissimilarities between pairs of *Vespa velutina nigrithorax* chemical cues. Colonial origins are coloured and activities are represented by different logos.

Chemical biomarkers between workers' activities

With our model including animal foragers, builders and other workers called GM where guardians and material foragers were clustered, five chemical compounds are significantly discriminant (LEfSe, $p < 0.05$). Among them, 4,8-diMe-7-nonen-2-one (P7) and β-Citronellol-methyl-ether (P9) are biomarkers of animal foragers. Builders have 3 biomarkers: Isoamyl isovalerate (P3), Decane-2,9-dione (P14) and X-C12:1 + 4,8-diMe-1,7-nonadiene (P5). None chemical biomarkers have been found for GM group (**Fig. 3**).

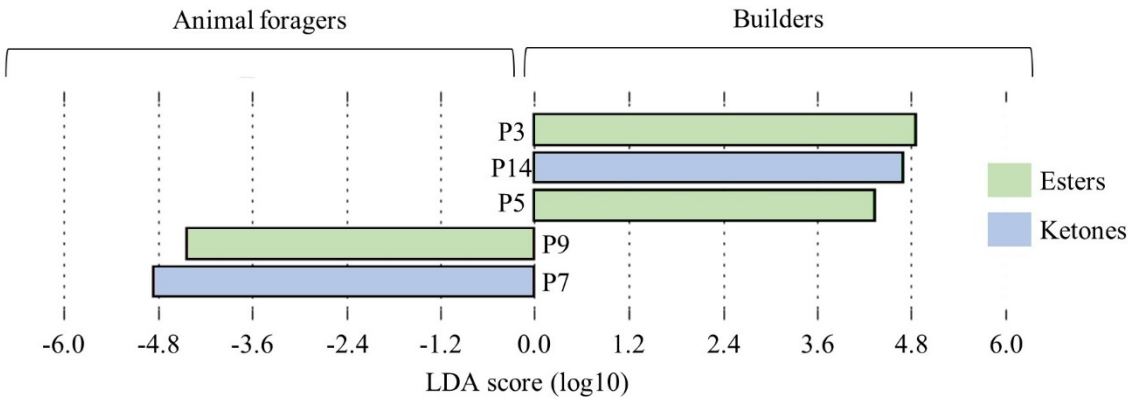


Fig. 3. LEfSe representing discriminant compounds (LDA score (log10) > |2,5|; $p < 0.05$). The chemical compounds contribution at peak level is tested between animal foragers, builders, and other workers clustered (*i.e,* guardians and material foragers, called GM).

Discussion

Colonial signature of the venom gland composition

In this study, we demonstrate that the venom gland composition of workers in *V. velutina nigrithorax* differs between colonial origin. In ants *Oecophylla longinoda* and *Atta capiguara*, the chemical composition of mandibular glands, the organ which produced the alarm pheromone, differs among colonies (Bradshaw et al. 1979b; Hughes et al. 2001). These cephalic odours have been demonstrated as responsible for nestmate recognitions processes in ants *Camponotus rufipes*. In fact, a relationship between territorial behaviour and conspecific recognition has been suggested, using alarm pheromone to chemically mark territories and thus, serve as recognition signals (Jaffe and Sanchez 1984). Our study demonstrates that the composition of the venom gland differs between colonies in another Hymenopteran species, thus supporting the hypothesis that alarm pheromones could be also used as recognition cues in Vespidae.

Activity odour of the venom gland composition

The venom gland composition of workers is different according to the activity performed by worker hornets. Except guardians which are not different from material foragers,

all workers are chemically different from each other's. This result was also observed in other species. In honey bees, the alarm pheromone production is influenced by task specialization, where foragers produced more some chemical compounds compared to guardians, fanners or nurses (Allan et al. 1987). In the same way, in *Apis cerana*, foragers produced more benzyl acetate than guardians (Wen et al. 2017a).

The alarm pheromone composition can be also modulated by the age of individuals. Indeed, in bees, the 2-heptanone compound increases through the life cycle (Vallet et al. 1991), and the isopentyl acetate is absent in newly emerged individuals but present in older ones (Boch and Shearer 1966). In ants *Platythyrea punctata*, young individuals which performed tasks inside the colony have quantitatively less (S)-(−)-actinidine and (S)-(−)-citronellal than foragers (Pokorny et al. 2020). In a previous study on the chemical signature of different types of workers in *V. velutina nigrithorax*, a chemical task specialization has been suggested which some discriminant compounds. Among these cuticular compounds, few have been identified as age indicators in other species, thus suggesting an age polyethism (Haouzi et al. in prep, **Chapitre 3**). This study suggests a new time, the presence of a potential polyethism. However, control the age of hornets, keep their social behaviours and their colonial activities without affecting nest is currently impossible, but are necessary to confirm this view.

The juvenile hormone (JH) could also modulate the alarm pheromone and aggressive behaviours. In fact, it has been demonstrated in *Apis mellifera*, that the JH analogue application induces the premature production of 2-heptanone and isopentyl acetate, two alarm compounds (Robinson 1985). Also, in honey bees, the JH levels are correlated with aggressive behaviour (Robinson 1987), suggesting it importance in task specialization. This hormonal regulation between workers could be explained our results about their chemical specialization when they performed different activities.

The chemical composition of the alarm pheromone between *V. velutina* workers could be explained by both the age of individuals and their activities performed, thus suggesting a chemical task specialization in Vespidae with an age polyethism. It is also possible that intrinsic factors justified this chemical specialization between workers.

Chemical biomarkers

In this study, five chemical biomarkers have been found in animal foragers and builders. Among them, the 4,8-dimethyl-7-nonen-2-one is determinant of animal foragers, and was describing as a major compound in this species (Berville et al. 2023). It is known in *Vespa orientalis,* that ketones elicit an alarm behaviour (Saslavasky et al. 1973). The β-Citronellol-methyl-ether is also determinant of animal forager. Based on our knowledges and as suggested in a previous study, this compound has been identified as a potential semiochemical with toxic effects (Berville et al. 2023).

In builders, the isoamyl isovalerate seems to be a chemical determinant of this activity. This compound was also found in the venom of *Vespa crabro* (Wheeler et al. 1983). Equally, as explained above, the decane-2,9-dione is also determinant of this worker type, and has been previously identified as a potential chemical compound with toxic effects (Berville et al. 2023).

Alarm pheromone is known to have a dual role. In Vespidae, the alarm pheromone is used to activate nest defence and induced nestmates recruitment (Bruschini et al. 2008b), but also to mark foraging sites (Ono et al. 2003). The chemical composition differences observed between animal foragers and builders could transmit different informations. In fact, it is possible that animal foragers used this pheromone to mark a foraging site, while builders used it to signal a defect or a break in the nest, and therefore an urgent need to rebuilt it. Further behavioural studies are needed to investigate these points.

Conclusion

To conclude, *V. velutina nigrithorax* workers have a colonial alarm pheromone and they are chemically different according to their activity, except for material foragers and guardians. This distinction among colonies suggested recognition processes. Differences between activities could in turn, be explained by a chemical task specialization and modulated by an age polyethism. Also, some semiochemicals which are discriminant for workers types were identified. Finally, it is possible that other factors influence the alarm pheromone composition between workers such as social environment (Verheggen et al. 2009) or intrinsic factors for example, but further experiments are necessary to support these assumptions.

Supplementary materials

Table S1. P-values obtained by pairwise adonis comparisons, using the Permanova tests between workers colonies. **Bold** values are statistically significant ($p < 0.05$).

	Villedieu-les-Poêles	Ballan-miré	Chérencé le Héron	Joué les Tours	St Cyr sur Loire	Saint-épain	Thilouze	Tours
Ballan-miré	**0.001**	-	-	-	-	-	-	-
Chérencé le Héron	0.103	0.059	-	-	-	-	-	-
Joué les Tours	**0.006**	**0.024**	**0.016**	-	-	-	-	-
St Cyr sur Loire	**0.001**	**0.001**	**0.001**		-	-	-	-
Saint-épain	**0.001**	**0.001**	**0.001**	**0.002**	0.087	-	-	-
Thilouze	**0.001**	**0.034**	**0.001**	**0.005**	0.065	-	-	-
Tours	**0.001**	**0.001**	**0.001**	**0.001**	**0.001**	**0.001**	**0.001**	-
Amboise	**0.001**	**0.034**	**0.001**	0.084	**0.037**	**0.006**	**0.023**	**0.001**

Chapitre 4 : Effet des acides gras insaturés sur la signature chimique



Chapitre 4 : Effet des acides gras insaturés sur la signature chimique

Résumé du chapitre

Dans les sociétés d'insectes, les CHCs peuvent être considérés comme le visa de l'insecte afin de communiquer son identité aux congénères. Ils sont donc essentiels au bon fonctionnement de l'organisation sociale. Cette signature chimique qui peut être variable entre les individus, mais également au cours de la vie de l'insecte, est modulée par différents facteurs intrinsèques et extrinsèques. Parmi les facteurs externes, le régime alimentaire est connu pour impacter le profil cuticulaire de certaines espèces d'insectes. Les lipides en provenance du régime alimentaire, sont utilisés pour stocker de l'énergie et peuvent être utilisés dans la synthèse de phéromones. En particulier, les acides gras pourraient être utilisés comme des précurseurs dans la voie de biosynthèse des CHCs. Cette étude avait donc pour but d'étudier l'effet d'un apport d'acides gras insaturés sur la signature chimique des frelons *V. velutina nigrithorax* âgés de moins de 24 h et d'adultes plus âgés (ouvrières). Pour cela, chaque frelon a reçu une injection d'huile d'olive (acides gras insaturés) dans l'abdomen, et les CHCs ont ensuite été analysés. Les analyses ont révélé que cette injection modifiait la signature chimique des adultes contrairement aux individus nouvellement émergés, et que seule la production d'alcènes était impactée. Ces résultats suggèrent ainsi que les acides gras insaturés pourraient être des précurseurs dans la voie de biosynthèse des alcènes. Les alcènes pouvant être utilisés comme des signaux de reconnaissance, il est aussi probable que l'apport d'acides gras insaturés via le régime alimentaire puisse participer à l'acquisition d'une signature chimique propre à la colonie. À l'inverse, aucun impact sur la composition en alcènes des émergents n'a été démontré, suggérant que la voie de biosynthèse des alcènes n'était probablement pas opérationnelle à ce stade. Ce chapitre a donc révélé que les acides gras insaturés présents dans l'alimentation pourraient jouer un rôle sur la composition en alcènes de la signature chimique

des frelons au stade adulte, et pourraient donc être utilisés pour moduler leur signature coloniale.

The role of unsaturated fatty acids on the chemical signature is dependent to the age of individuals in the Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*

In preparation as: Haouzi M., Sevestre H., and Darrouzet E. The role of unsaturated fatty acids on the chemical signature is dependent to the age of individuals in the Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*

Abstract

Cuticular hydrocarbon compounds (CHCs) are important chemical cues for nestmate recognition, and thus they contribute to the social organisation of insects. These CHCs which represent the chemical signature of individuals, can be affected by biotic or abiotic factors. Among external factors, diet has been shown to modify the chemical signature in some insect species. CHCs biosynthesis pathway can include fatty acids as substrates. This study aimed to analyse the unsaturated fatty acids intake on the chemical signature of workers in the invasive Yellow legged hornet *Vespa velutina nigrithorax,* at two different ages (old adult workers *vs* callows). Results showed that such unsaturated fatty acids modify the cuticular profiles of old workers, but not in callows. More specifically, alkenes' production was impacted, thus suggesting that unsaturated fatty acids could be used as precursors for alkenes biosynthesis pathway in adults. Diet could therefore modify recognition cues in this invasive species and can act in the acquisition by young hornets of the colonial chemical signature.

Key-words: Cuticular Hydrocarbon Compounds, biosynthesis, diet, lipids, Vespidae,

Introduction

In social insects, nestmate recognition is a major component of their social organisation (Hölldobler and Wilson 1990), requiring a great variety of signals (Leonhardt et al. 2016). Among them, Cuticular Hydrocarbons Compounds (CHCs) are pheromones on the insect cuticle, and essential mediators for nestmate recognition (Van Zweden and D'Ettorre 2010).

CHCs can be different in Vespidae according to their species and colonies (Soares et al. 2017), but also to their castes and sexes (Gévar et al. 2017; da Silva et al. 2021), and can therefore be used by insects to discriminate individuals (Hefetz 2007). These recognitions cues could be dynamic during the life cycle of insect's colonies (Vander Meer et al. 1989). In fact, CHCs which represent the chemical signature of individuals can be modified by endogenous (Darrouzet et al. 2014; Vernier et al. 2020) and/or exogenous (Rouault et al. 2001) factors.

Among external factors, diet has been demonstrated to impact the chemical signature of insects, thus suggesting interactions between CHCs biosynthesis and metabolic changes. Indeed, in *Phaedon cochleariae*, differential inputs of fatty acid induce quantitative changes on the cuticular profile (Otte et al. 2015). In the same way, this phenotypic plasticity has been highlighted when individuals exhibit different CHCs in function of their host plant (Otte et al. 2018). Moreover, in ants *Linepithema humile*, their chemical signature correspond to cuticular pattern of their prey (Liang and Silverman 2000), but also, in flies *Drosophila melanogaster*, where different diets give different cuticular profiles (Fedina et al. 2012).

In insects, lipids are used to stock energy in the fat body (Van Der Horst 2003; Chapman 2013). Lipid digestion needs lipases, necessary for the lipolysis processes in order to degrade dietary lipids to fatty acids, glycerols, partial acylglycerols, and phospholipid derivatives (Turunen 1979; Chapman 2013). Lipases are produced and be active in the midgut (Majerowicz and Gondim 2013), the site of lipids digestion and absorption for most insects (Holtof et al. 2019). After that, when lipids are transformed in the midgut, the final products are absorbed by the apical cell membrane of epithelial cells, and then they can be released from the basal membrane into the hemolymph to be transported to their site of action (Holtof et al. 2019). Pheromones can be synthetized from lipids dietary (Yew and Chung 2015), suggesting the importance of fatty acids in chemical communication systems.

It has been shown that dietary fatty acids could be use as CHCs biosynthesis pathway precursors (Stanley-Samuelson et al. 1988), suggesting that a differential intake of fatty acids could modify the chemical signature. The CHCs biosynthesis occurs in oenocytes and include different steps. First, fatty acids precursors are formed with straight chain, methylated saturated or not, and elongated into Acyl-CoA. These compounds are converted into aldehyde and undergo an aldehyde decarboxylation which convert them to hydrocarbons. Finally, they are transported via lipophorin to the insect cuticle. Generally, the CHC biosynthesis can use three different ways to obtain linear alkanes, branched alkanes or alkenes of different lengths. (Bagnères and Blomquist 2010; Blomquist and Ginzel 2021). These CHCs can have different functions according to their structural proprieties. Alkanes are principaly used to protect insects from dessication with waterproofing capabilities (Gibbs 1998, 2002) whereas branched alkanes are maily involved in colonial recognition (Dani et al. 2001; Lucas et al. 2004; Martin et al. 2008a). Alkenes are the most CHCs involved in communication with several functions (Drijfhout et al. 2009), such as for nestmates recognition (Dani et al. 2001).

The Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* is a generalist and opportunistic predator, which captures insects and transforms it into pellet to feed larvae (Rome et al. 2021). For their part, adults feed on sugary liquids (honeydew, nectar, etc.) as well as on a protein-rich liquid regurgitated by larvae (Matsuura and Yamane 1990). Because of its appetence to entomofauna and especially honeybees, it is well known to impact negatively beekeeping activities (Requier et al. 2018, 2019; Leza et al. 2019). This invasive species was accidentally introduced in the south of France around 2004 (Haxaire et al. 2006), then spread rapidly through Europe (Robinet et al. 2018). Despite an inbreeding situation (Arca et al. 2015; Darrouzet et al. 2015b), the Yellow legged hornet presents a heterogeneous chemical signature according to their caste, gender and colonies (Gévar et al. 2017), and their cuticular profiles evolves rapidly during the first 48 hours of adult life (Haouzi et al. in prep, **Chapitre 2**). However, mechanisms

of regulation and in particular the impact of epigenetic factors such as lipids metabolism are unknown. This study aimed to investigate the unsaturated fatty acids intake on the chemical signature of old and young workers (less than 24 hours-old callows). We hypothesized that unsaturated fatty acids will affect *V. velutina nigrithorax* chemical signatures and probably mainly alkenes because of their carbons double bonds.

Materials and Methods

Insects sampling and breeding

In Centre-Val-de-Loire region (France), 10 different *Vespa velutina nigrithorax* colonies were collected in the field in 2021 (**Fig. 1**). For each colony, nests were opened, and both adult workers and combs were randomly selected and separated. Workers were placed after collection in a plastic breeding box with aeration (L95 x W65 x H65 mm) at ambient temperature, then fed with honey and water *ad libitum*. Combs were placed in plastic boxes and were checked daily Each callow was isolated on their day of birth (between 0 and 24 hours), and reared as old workers. Workers collected in the field which have more than 24 hours are considered in this study to be the oldest individuals; but their exact age was unknown.

Experimental treatments

Three treatments were carried out on old workers. To test the effect of unsaturated fatty acids on the chemical signature, 10 µl of olive oil was injected with a syringe (Hamilton, 10µl) into the hemolymph of the abdominal cavity of workers. Because it was very difficult to control the quantity of fatty acids ingested by insects, we preferred to inject directly these fatty acids in the hemolymph. Two negative controls were performed: a first one (called: Sting) with the syringe but without any injection to mimic the effect of the sting itself (abdominal cavity piercing), and a second (called: Control) without any treatment. To performed oil and syringe treatments, hornets were immobilized on a pad that emitted CO_2. Subsequently, hornets were

frozen killed 2 or 6 hours after these both treatments. For each treatment modality, 3 technical replicates were performed per nest (N=150 hornets, 10 colonies) (**Fig. 1**).

Young callows (between 0 and 24 h) were submitted to the same protocol. Six colonies were used (**Fig. 1**) and one technical replicate was performed for each modality, per colony (N=30 hornets, 6 colonies).

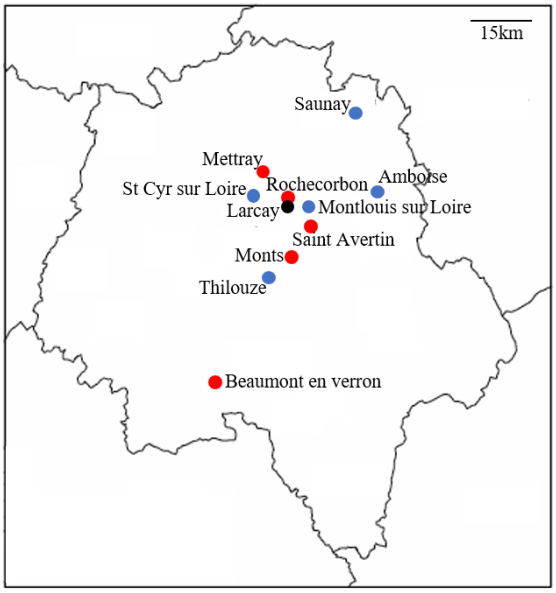


Fig. 1. Cartography of colonies sampling in France, Centre Val de Loire region, Indre et Loire department. Red cities correspond to workers sampling, black to callows sampling and blue to both sampling.

Chemical analyses

To extract CHCs just after death, each hornet was placed in a concave glass vial with 1 ml of heptane and vortexed 1 min head up and 1 min head down. Then, 500 µl of the extract was placed in a new glass vial, and 10 µl of n-ecoisane at 10^{-3} g/ml corresponding to the internal standard was added and vortexed for 10 sec (Gévar et al. 2017).

For each sample, 2 µl was analysed using a gas chromatograph Agilent 7890B (GC) coupled to a Mass Spectrometer (MS) Agilent 7000 Triple Quad (Les Ulis, France), using an autosampler (Gerstel, RIC, Belgium). The GC was equipped with a Zebron ZB-5HT column (30m x 0.25mm x 0.25 µm; 5% Phenyl - 95% Dimethylpolysiloxane, Phenomenex, Torrance, CA, USA) and helium gas (1.2 ml/min) was used. Injectors were in splitless mode with a

splitless time of 2 min at a constant temperature of 250°C. The temperature program used start with an initial temperature ramp from 50°C to 200°C at 8 °C/min, a second temperature ramp from 200°C to 315°C at 5°C/min, and a 5-min final hold at 315°C. Electron impacts at 70 eV were recorded in scanning mode every 0.3 s with a scan interval of 0.1 s and a mass scan range of 40–600 amu, driven with the software Agilent MassHunter B.07.00. Data were analysed with MassHunter Qualitative Analysis (v. 10.0, Agilent), and AMDIS v. 2.3, NIST 2017 softwares. Compounds were then identified with their mass spectra, interpreted via fragmentation analyses (McLafferty F and Turecek F 1993) and assigned according to previous published spectra (Gévar et al., 2017 ; Haouzi et al. in prep, **Chapitre 2**). Peaks integration was done using the MassHunter Quantitative Analysis software (v. 10.2, Agilent technology).

Unsaturated fatty acids composition

This analysis is in progress and preliminary results will be presented in the supplementary materials section.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software (R v4.1.0). Because both a colonial heterogeneity in the Yellow-legged hornet has been previously demonstrated and to avoid pseudo replication, technical replicates (*i.e.* sample replicates by treatment by hour by nest) were pooled and averaged for workers (old hornets) in all statistical analyses.

The total proportion of CHCs by sample was calculated by dividing each peak area by the sum of all the peak's areas. Relative abundances at the chemical family level (alkanes, alkenes and branched alkanes) were also calculated by dividing the area of each peak by the sum of the peaks belonging the same chemical family. At the chemical family level, mixed compounds in the same peaks were excluded from the analysis.

To test the effect of treatments on the total chemical signature and at chemical family level, we performed four Permutational Analysis of Variance (PERMANOVA, n = 999 permutations) on the Bray-Curtis dissimilarity matrices, using the adonis2 function from the vegan package (v2.6-2) (Oksanen et al. 2022) for each age group (callows and workers). In these models, relative abundances were entered as continuous variable, and treatments and hours as explicative variables. The interaction between treatments and hours variables were tested, and the colonial variable was entered as stratification variable. Then, pairwise comparisons were performed when significant effect were observed, using the pairwise.adonis2 function from the pairwiseAdonis package (v0.4) (Martinez Arbizu 2017). Chemical composition dissimilarities between samples were illustrated with two-dimensional Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the ape package (v5.6-2) (Paradis and Schliep 2019).
Afterwards, Kruskal Wallis tests were performed to see if the sum of the relative abundance of each chemical family on the total signature differs between treatments in callows and workers. When significant effects were observed, Dunn's tests with Bonferroni correction were performed using FSA (v0.9.3) (Ogle et al. 2022) and dunn.test (v1.3.5) (Dinno 2017) packages.

Results

In workers, a total of 44 peaks have been described and belong to three distinct chemical families: 25 are branched alkanes, 6 are alkenes, 5 are alkanes and 8 are mixed compounds. In callows, peaks 16 (6-MeC26), 17 (4-MeC26), 30 (5-,4/2-MeC28), 39 (X'',X'''-diMeC29) and 44 (X'',X'''-diMeC31) are too weak and were therefore excluded. Also, peaks 35 (5-MeC29 + 11-,15-diMeC29) and 36 (X-C30:1 + 9-,15-diMeC29) were inseparable and thus considered in one peak in callows. So, callows are decribed by 19 branched alkanes, 6 alkenes, 5 alkanes and 9 mixed compounds (**Table S1**).

First, in old workers, the interaction between the hour after injection and treatment variables was not significative (PERMANOVA, $R^2 = 0.003$, $p = 0.738$) and the hour effect was not significant determinant ($R^2 = 0.004$, $p = 0.578$) on the global chemical signature (all CHCs). A lower effect of treatments was demonstrated and significantly influenced the variability in the chemical compound compositions among workers ($R^2 = 0.030$, $p = 0.016$). Compared in pairs, oil treatment is significantly different from the sting ($p = 0.015$) and the control ($p = 0.005$). The sting and the control are not significantly different ($p = 0.775$) (**Fig. S1**).

At alkanes ($R^2 = 0.009$, $p = 0.559$) and branched alkanes ($R^2 = 0.017$, $p = 0.293$) levels, treatments not significantly influenced the variability in the chemical compound compositions among workers, contrary to alkenes ($R^2 = 0.030$, $p = 0.038$) (**Fig. 2**). In fact, compared in pairs, oil treatment is significantly different from the sting ($p = 0.016$) and the control ($p = 0.007$). The sting and the control are not significantly different ($p = 0.888$). For all these chemical families, interactions between treatment and hour variables were not significative, and the hour effect was not significant determinant on their global chemical composition (**Table S2**).

The sum of the relative abundances of alkanes (Kruskal Wallis test, $p = 0.654$) and branched alkanes ($p = 0.932$) is not significantly different between treatments, contrary to alkenes ($p = 0.002$). In fact, the relative abundance of the oil treatment is significantly higher compared to the sting and the control (**Table S3, S4, Fig. 3**).

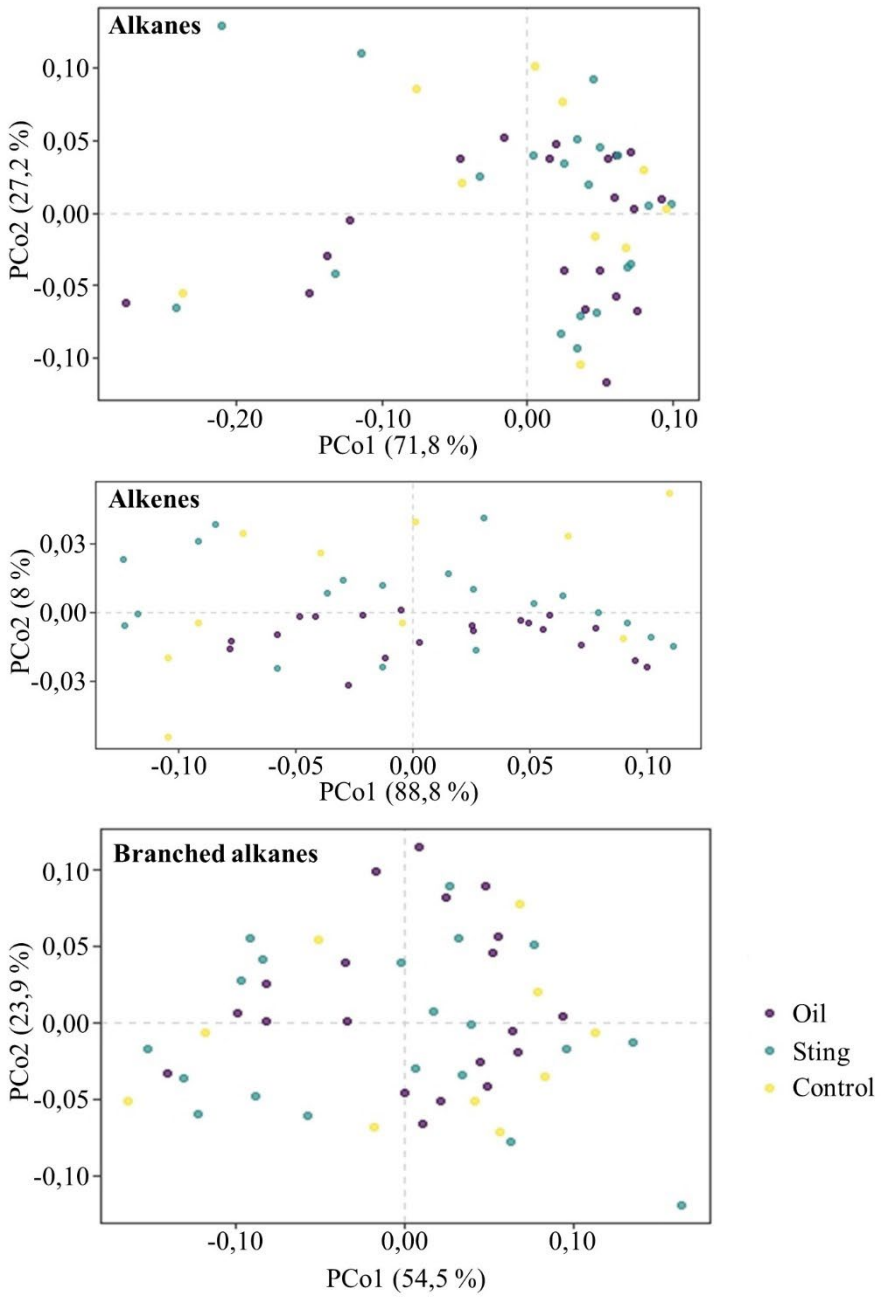


Fig. 2. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plots illustrating the Bray-Curtis dissimilarities between pairs of *Vespa velutina nigrithorax* workers chemical cues for alkanes, alkenes and branched alkanes. The chemical cues are coloured according to the treatments of hornets.

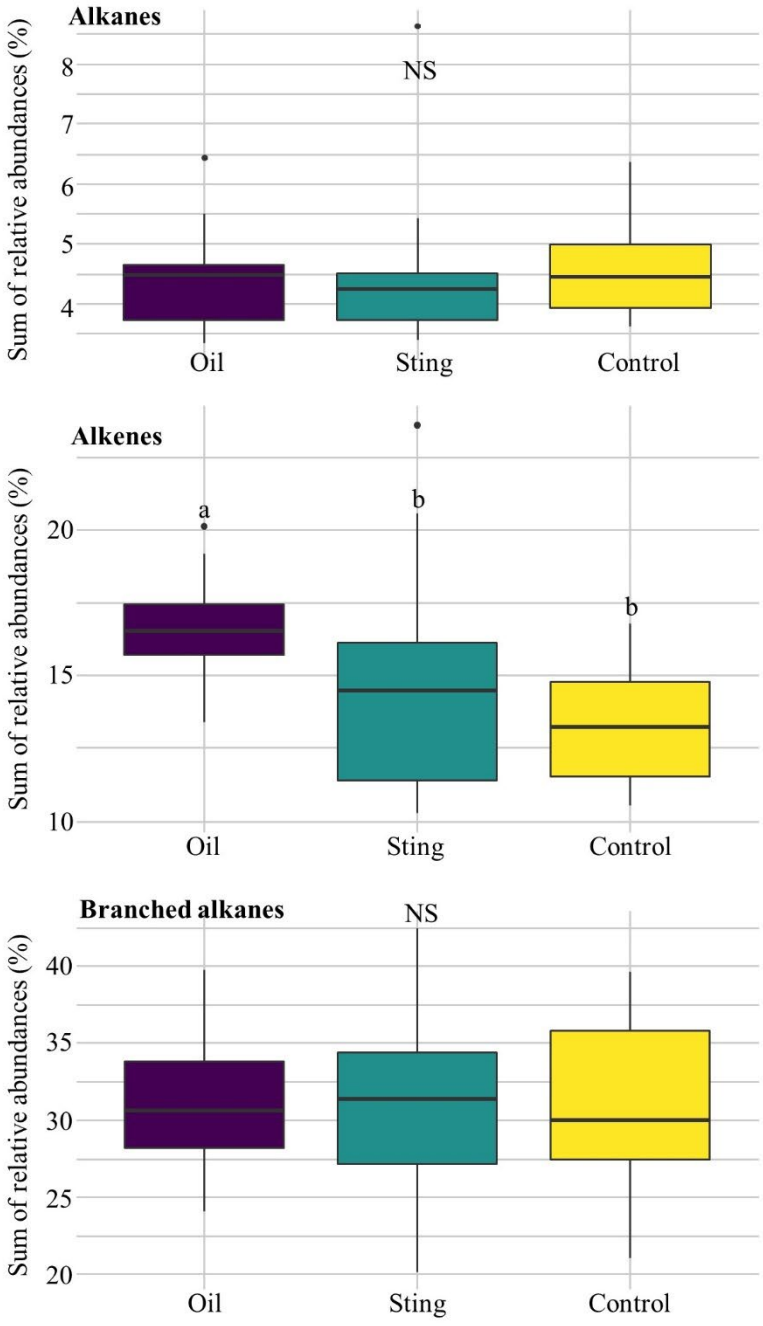


Fig. 3. Boxplots representing the sum of the relative abundances of alkanes, alkenes and branched alkanes in *Vespa velutina nigrithorax* workers with different treatments. Boxplots illustrate the median (middle bar) and the range between 1st and 3rd quartiles (box) with whiskers extending to the higher and lower inner values. Outliers are representing by independent points beside whiskers. NS = non-significant. Modalities with common letter are not significantly different ($p > 0.05$).

In callows, the interaction between the treatment and hour variables was not significative (PERMANOVA $R^2 = 0.011$, $p = 0.608$) and the hour effect was not a significant determinant ($R^2 = 0.066$, $p = 0.078$) of their global chemical signature. Lastly, treatments not

significantly influenced the variability in the chemical compound compositions among callows for the total chemical signature ($R^2 = 0.013$, $p = 0.479$) (**Fig. S2**). For alkanes ($R^2 = 0.003$, $p = 0.970$), alkenes ($R^2 = 0.013$, $p = 0.769$) and branched alkanes ($R^2 = 0.038$, $p = 0.474$) treatments not significantly influenced the chemical variability too (**Fig. S3**). However, contrary to other chemical families, the hour effect was significant determinant on the global composition of branched alkanes, and explaining 7% of the observed chemical variability (**Table S5**). For all chemical families, interactions between hour and treatment variables were not significative (**Table S5**).

The sum of the relative abundances of alkanes (Kruskal Wallis test, $p = 0.231$), alkenes ($p = 0.186$) and branched alkanes ($p = 0.967$) is not significantly different between treatments for callows (**Fig. S4**).

Discussion

In this study, after unsaturated fatty acids injections, old workers and callows presented a different response in their CHC profiles. In old workers, the injection affected the chemical variability of the total chemical signature (all CHCs) and in particular their alkenes chemical composition. Conversely, callows' chemical signature is not affected by such treatment for their total chemical signature or at the chemical family level.

The unsaturated fatty acids intake can change the chemical signature of old-workers and can increase the alkenes proportion. This result support the hypothesis that unsaturated fatty acids dietary can play a role on the CHCs biosynthesis pathway and could be used as precursors for alkenes production. These compounds could thus be absorbed by oenocytes in the abdominal integument, the site of CHC biosynthesis (Fan et al. 2003). Then, such new hydrocarbons could be released in the hemolymph and transported via lipophorins to the cuticle (Fan et al. 2002). In *Drosophila* species, the Desaturase 1 gene (desat1) could play a role in lipid metabolism and hydrocarbon production with the use of fatty acids such as palmitic and

stearic acids. This gene expressed in fat body (site of lipophorins synthesis) and oenocytes (site of CHCs biosynthesis), transforms palmitic and stearic acids to oleic acids which are precursors of fatty acids and hydrocarbons (Wicker-Thomas and Chertemps 2010). Also, in previous studies, a fatty acid diet can influence the chemical signature of insects, thus supporting the hypothesis to the use of fatty acids as CHC precursors (Etges et al. 2006; Otte et al. 2015). In fact, in *Drosophila mojavensis* larvae, the fatty acids composition of their diet determined the abundance of branched alkanes at the adult stage (Etges et al. 2006). In the same way, in *Phaedon Cochlearia*, different fatty acids diets provoked different cuticular profiles with quantitative changes in adults on alkanes and branched alkanes (Otte et al. 2015). To our knowledges, mechanisms of fatty acids on the CHCs biosynthesis are still unknown, but our results suggest that fatty acids could be used as precursors in the CHCs biosynthesis.

The recognition chemical communication system, with the use of CHCs, can be affected by external factors, such as the diet. Alkenes which are used in recognition processes (Dani et al. 2001), are the only hydrocarbons modified in our experiment in workers. As these hydrocarbons are key components for communication, and in particular, in the recognition behaviours, their modifications can *in fine* modulate the colonial chemical signature. In *Linepithema humile* ants, their chemical signature was modified by diet and colonies sharing the same diet obtained specific cues that could enable them to reduce aggression between each other (Buczkowski et al. 2005). The colonial signature acquisition is of great importance in social insects. The Gestalt model suggests that all nestmates share their CHCs through trophallaxy or grooming to obtain a common colonial odour (Crozier and Dix 1979). This gestalt odour is used by the colony to identify nestmates from intruders, and therefore is crucial to discriminate individuals (Hefetz 2007). However, the diet effect on the contribution of intercolonial variations is unknown in natural conditions (Sprenger and Menzel 2020).

Nevertheless, with our results, we suppose that the gestalt model and diet specific to colonies could participate of the colonial signature specificity as epigenetic factors.

Other factors can also modulate the chemical signature of insects such as microbiote. In *Acromyrmex echinatior*, it has been shown that alteration of the intestinal microbiota affects individual recognition and thus modifies CHC profiles (Teseo et al. 2019). Given that diet can affect gut microbiota, it is possible that these both factors could affect the chemical colonial signature of hornets and are responsible of behavioral changes. Further experiments are necessary to confirm this view.

The chemical signature of insects is dynamic and evolves with age (Winston 1987; Nielsen et al. 1999). In a previous study, in *V. velutina nigrithorax*, it has been demonstrated that their chemical signature evolves during the first 48 hours in callows, where their branched alkanes quantities increase rapidly to correspond to older workers (Haouzi et al. in prep, **Chapitre 2**). In callows, we have a significative effect of the hour treatment on the branched alkanes chemical family. This result suggests that the branched alkanes chemical composition evolves rapidly between 2 and 6 hours after treatments, and could be explained by the rapid dynamic previously demonstrated.

To conclude, unsaturated fatty acids intake has an impact on the chemical signature of workers, unlike to callows. This result suggest that unsaturated fatty acids could be used as precursors for some CHCs (alkenes) biosynthesis pathway in adult hornets, but not in callows where such biochemical pathways could be not operational during the first day of life in *V. velutina nigrithorax*. In hornets, diet is thus an important factor which could modify their recognition systems and probably alter their colonial signature but further experiments are necessary to support this point.

Supplementary materials

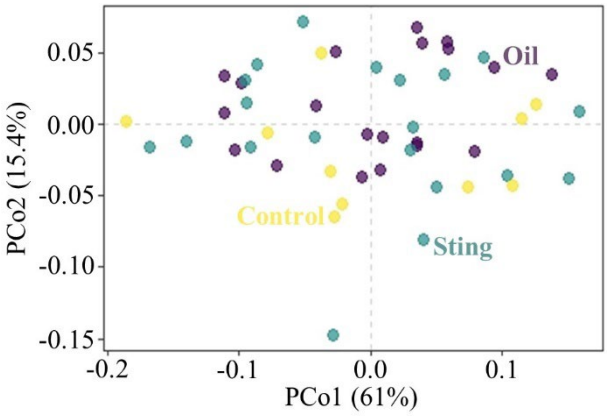


Fig. S1. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot illustrating the Bray-Curtis dissimilarities between pairs of *Vespa velutina nigrithorax* workers chemical cues for all cuticular hydrocarbon compounds. The chemical cues are coloured according to the treatments of hornets.

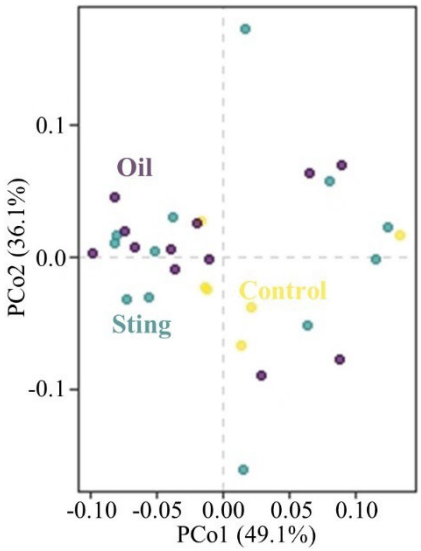


Fig. S2. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot illustrating the Bray-Curtis dissimilarities between pairs of *Vespa velutina nigrithorax* callows chemical cues for all cuticular hydrocarbon compounds. The chemical cues are coloured according to the treatments of callows.

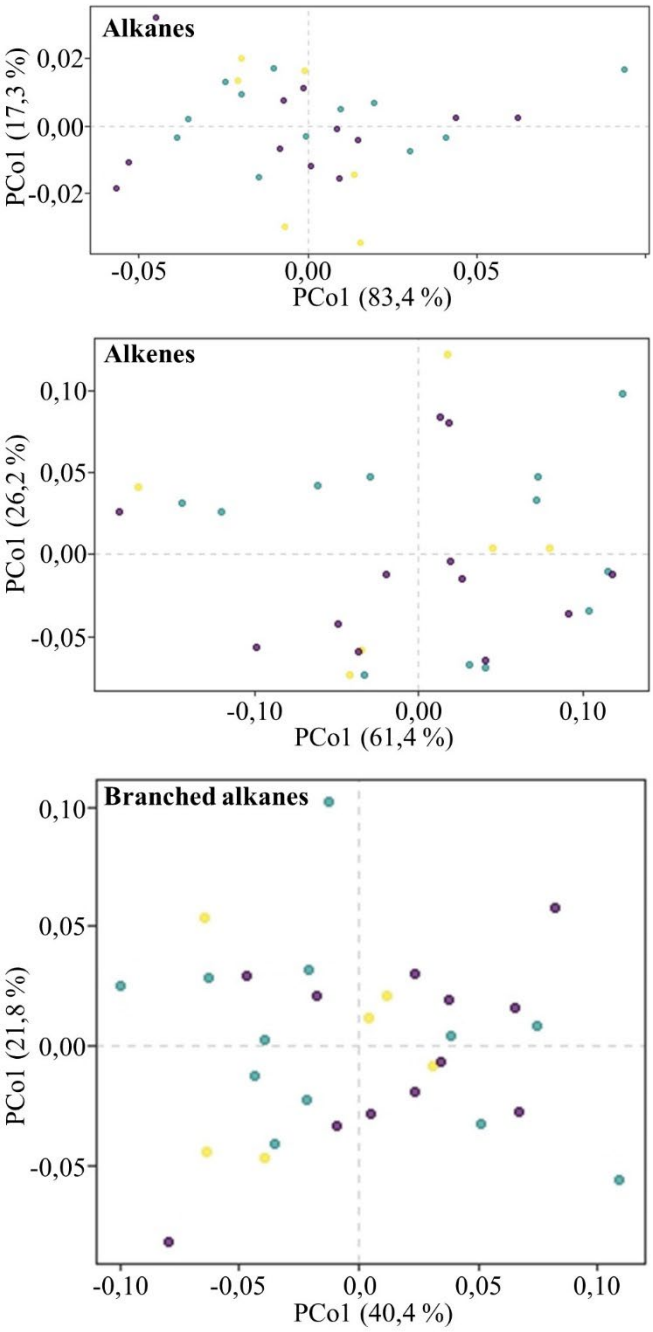


Fig. S3. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plots illustrating the Bray-Curtis dissimilarities between pairs of *Vespa velutina nigrithorax* callows chemical cues for alkanes, alkenes and branched alkanes. The chemical cues are coloured according to the treatments of callows.

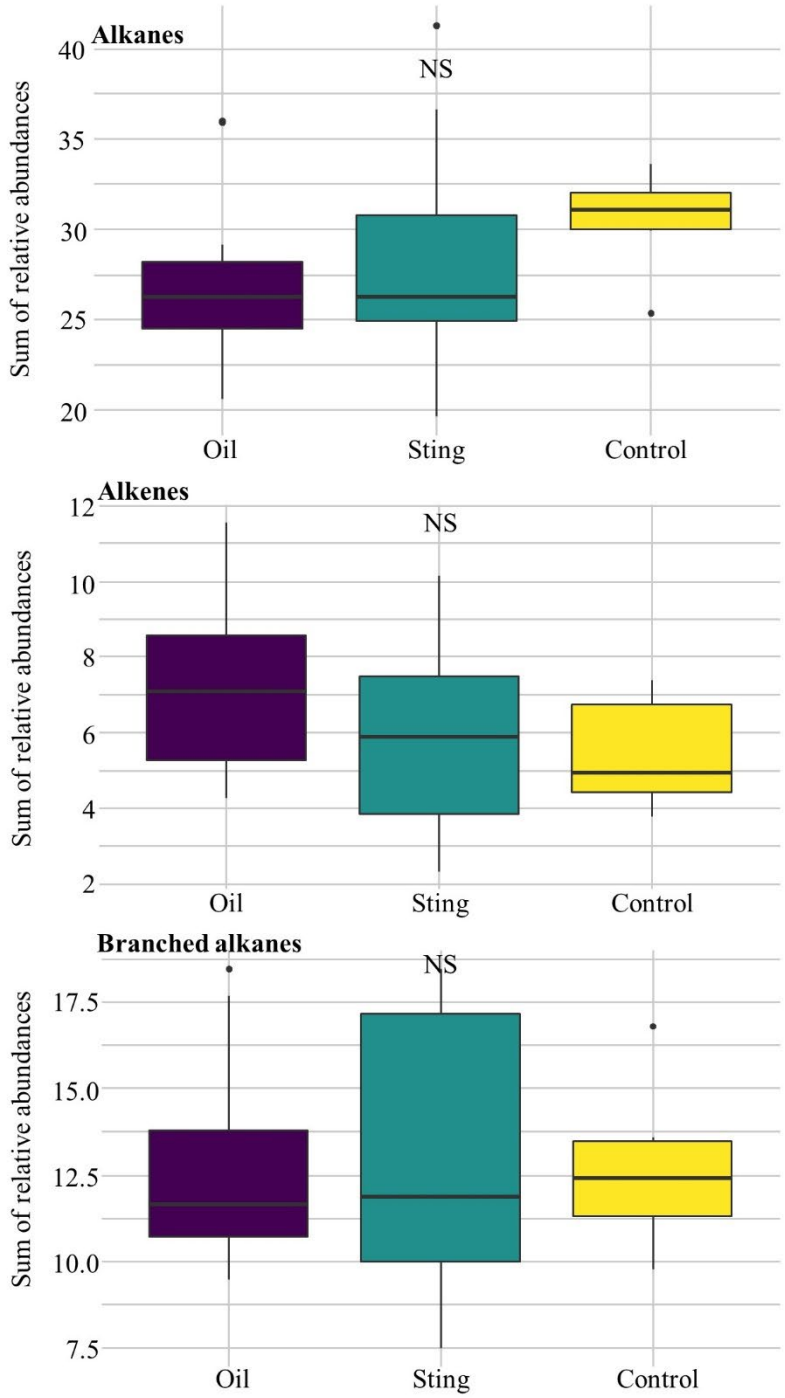


Fig. S4. Boxplots representing the sum of the relative abundances of alkanes, alkenes and branched alkanes in *Vespa velutina nigrithorax* callows with different treatments. Boxplots illustrate the median (middle bar) and the range between 1st and 3rd quartiles (box) with whiskers extending to the higher and lower inner values. Outliers are representing by independent points beside whiskers. NS = non-significant.

Table S1. Cuticular hydrocarbon compounds of *Vespa velutina nigrithorax* workers and callows. Peak number and retention time are represented. The percentages are represented for workers and callows controls (Means ± SE).

Chemical compound	Peak	Retention time	Workers (%)	Callows (%)
n-C21	1	24.58	0.027 ± 0.006	2.103 ± 0.297
n-C23	2	27.62	0.720 ± 0.105	24.844 ± 0.813
3-MeC23	3	28.57	0.026 ± 0.003	0.200 ± 0.026
n-C24 + unknown	4	28.98	0.283 ± 0.015	0.721 ± 0.029
X-C25:1	5	30.10	0.896 ± 0.151	1.615 ± 0.251
X'- C25:1	6	30.35	0.070 ± 0.012	0.204 ± 0.027
n-C25 + unknown	7	30.46	19.182 ± 0.894	23.556 ± 1.613
11 + 13-MeC25	8	30.95	0.924 ± 0.088	3.712 ± 0.307
7-MeC25	9	31.06	0.125 ± 0.010	0.482 ± 0.060
5-MeC25	10	31.19	0.336 ± 0.023	0.407 ± 0.053
3-MeC25 + X-C26:1	11	31.60	3.622 ± 0.170	3.652 ± 0.158
X,X'-diMeC25	12	31.68	0.158 ± 0.013	0.126 ± 0.014
n-C26	13	31.90	1.785 ± 0.057	0.690 ± 0.058
X'',X'''-di-MeC25	14	31.99	0.200 ± 0.017	0.095 ± 0.012
13-,11-,9-,7-MeC26	15	32.37	0.351 ± 0.027	0.440 ± 0.062
6-MeC26	16	32.53	0.058 ± 0.006	absent
4-MeC26	17	32.75	0.220 ± 0.019	absent
X-C27:1 + X'-C27:1	18	33.00	8.101 ± 0.557	1.972 ± 0.306
X"-C27:1	19	33.08	0.667 ± 0.040	0.417 ± 0.044
n-C27 + X-MeC27:1	20	33.33	20.482 ± 0.796	13.374 ± 1.114
X-MeC27:1 + 13-,11-,9-MeC27	21	33.77	7.218 ± 0.567	9.421 ± 0.800
7-MeC27	22	34.88	1.160 ± 0.076	1.003 ± 0.137
5-MeC27	23	34.02	0.577 ± 0.038	0.126 ± 0.023
11-,15-,9-,X-diMeC27	24	34.16	2.662 ± 0.200	0.831 ± 0.093
3-MeC27	25	34.34	8.687 ± 0.216	1.618 ± 0.171
5-,15-diMeC27 + 2-,13-diMeC27 + 2-,15-diMeC27	26	34.45	0.824 ± 0.045	0.187 ± 0.012
n-C28	27	34.67	0.418 ± 0.021	0.219 ± 0.026
X,X'-diMeC27 + X''-MeC28	28	34.80	1.239 ± 0.112	0.162 ± 0.009

X,X'-di-MeC28 + X''-,X'''-di-MeC28	29	35.15	0.605 ± 0.047	0.188 ± 0.038
5-,4/2-MeC28	30	35.47	0.262 ± 0.024	absent
X-C29:1	31	35.73	3.385 ± 0.261	1.170 ± 0.211
X'-C29:1 + unknown	32	35.85	2.391 ± 0.304	0.073 ± 0.017
n-C29	33	36.00	1.659 ± 0.117	2.673 ± 0.234
13-,11-,9-,7-MeC29	34	36.45	2.117 ± 0.309	2.130 ± 0.235
5-MeC29 + 11-,15-diMeC29	35	36.78	2.092 ± 0.146	0.542 ± 0.085
X-C30:1 + 9-,15-diMeC29	36	36.86	0.835 ± 0.060	
3-MeC29	37	36.98	0.569 ± 0.034	0.008 ± 0.008
X,X'-diMeC29	38	37.08	0.437 ± 0.033	0.008 ± 0.008
X",X'"-diMeC29	39	37.37	0.459 ± 0.034	absent
X-C31:1	40	38.31	0.247 ± 0.033	0.056 ± 0.010
Unknown	41	38.57	0.106 ± 0.017	0.004 ± 0.001
11-MeC31	42	38.95	0.897 ± 0.144	0.723 ± 0.141
X,X'-diMeC31	43	39.31	2.570 ± 0.249	0.252 ± 0.044
X'',X'''-diMeC31	44	39.53	0.353 ± 0.039	absent

Table. S2. P-values and the partial R^2 obtained using the Permanova tests for workers. Both interactions between treatment and hour variables, and the hour effect on the chemical composition for alkanes, alkenes and branched alkanes are calculated.

	Treatment*Hour		Hour	
	R^2	p-value	R^2	p-value
Alkanes	0.009	0.215	0.004	0.581
Alkenes	8.e-04	0.819	0.002	0.694
Branched alkanes	0.005	0.539	0.004	0.678

Table. S3. P-values obtained by pairwise comparisons using Dunn-Test with Bonferroni correction for workers, at the alkene chemical family level. Significant results are in **bold** ($p < 0.05$).

	Control	Sting
Sting	1.000	-
Oil	**0.005**	**0.022**

Table S4. Mean of relative abundances (%) of each hydrocarbon family for each treatment (± SE)

	Alkanes	Alkenes	Branched alkanes	Mixed compounds
Oil	8.781 ± 2.097	27.772 ± 10.900	10.723 ± 2.383	65.175 ± 19.019
Sting	8.903 ± 2.184	24.321 ± 9.491	10.895 ± 2.507	67.148 ± 19.990
Control	9.217 ± 3.452	22.276 ± 12.730	11.163 ± 3.513	67.648 ± 29.673

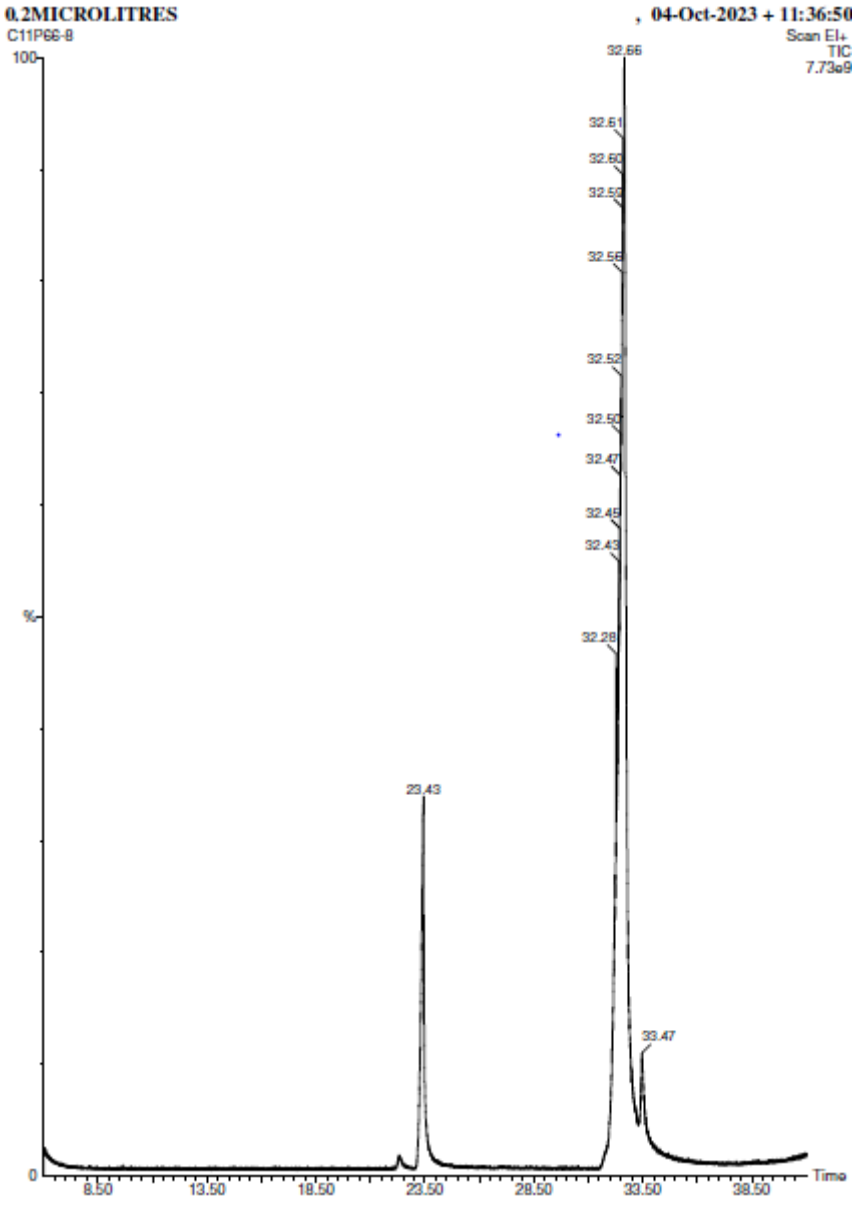
Table. S5. P-values and the partial R^2 obtained using Permanova tests for callows. Both interactions between treatment and hour variables, and the hour effect on the chemical composition for alkanes, alkenes and branched alkanes are calculated. **Bold** values are statistically significant ($p < 0.05$).

	Treatment*Hour		Hour	
	R^2	p-value	R^2	p-value
Alkanes	0.001	0.882	0.007	0.714
Alkenes	0.007	0.663	0.013	0.441
Branched alkanes	0.042	0.102	0.069	**0.015**

Unsaturated fatty acids composition

Retention time	Identification
22.33	(Z)-Methyl hexadec-11-enoate
23.43	Methyl palmitate
31.79	(Z,Z)-Methyl-9,12-Octadecadienoate
32.60	(Z)-Methyl-9-Octadecenoate
32.90	(Z)-Me-6-octadecenoate
33.47	Methyl stearate

Identification and retention times of compounds found in the olive oil



Olive oil chromatogram with different peaks identified

Discussion Générale

“Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles.”

Marie-Curie

Les insectes eusociaux possèdent un système de communication efficace et performant, permettant une organisation sociale élaborée ainsi qu'un potentiel invasif plus élevé. Comprendre les systèmes de communication de ces insectes est donc un enjeu majeur afin de mieux les réguler. C'est pourquoi, cette thèse a pour but d'étudier deux substances sémiochimiques majeures de la communication chimique chez un insecte à la fois social et invasif, le frelon à pattes jaunes *Vespa velutina nigrithorax*. La phéromone d'alarme, permettant de jouer un rôle indispensable dans la protection et la survie de la colonie, et donc le maintien de cette espèce invasive, ainsi que les CHCs qui représentent la signature chimique de l'insecte ont été étudiés. Ces molécules chimiques essentielles à l'organisation et à la cohésion sociale, pourraient favoriser et être au cœur de leur succès invasif.

Le premier objectif de la thèse était d'analyser la composition chimique de la phéromone d'alarme issue de la glande à venin en fonction des différentes castes (**Chapitre 1**). Comme précédemment observée sur la signature chimique des frelons (Gévar et al. 2017), une hétérogénéité chimique en fonction de la caste des femelles a été mise en évidence. Ces résultats ont mis en avant une dynamique chimique de la phéromone d'alarme en fonction du cycle biologique des femelles. Ce chapitre sera discuté dans la partie **I.A.a**. Par la suite, afin d'analyser de manière plus approfondie cette dynamique, le second objectif de la thèse était d'étudier la composition chimique des CHCs et de la phéromone d'alarme en fonction de l'âge des individus. Également, l'acquisition du profil en CHCs par l'environnement social a été analysée (**Chapitre 2**). Les résultats ont confirmé que pour les deux types de substances sémiochimiques, la composition chimique variait en fonction de l'âge des individus, avec notamment une acquisition rapide du profil cuticulaire en moins de 48 heures. Cette dynamique chimique ainsi que l'importance des signaux de reconnaissance seront respectivement discutées dans les parties **I.A.b** et **I.B.a**. Cependant, les analyses n'ont pas permis de mettre en avant une acquisition de la signature chimique par l'environnement social, probablement dû à un manque

de représentativité des conditions naturelles ou temporelles. Ce résultat sera discuté dans la partie **I.B.b**. Par la suite, le troisième objectif de la thèse était d'étudier la composition chimique des CHCs et de la phéromone d'alarme au sein de la caste des ouvrières en fonction de l'activité qu'elles menaient à un instant donné au sein de la colonie (**Chapitre 3**). Ces travaux ont permis de mettre en avant une spécialisation chimique des ouvrières en fonction de leur activité pour ces deux composés sémiochimiques, qui sera discutée dans la partie **II.A**. Les résultats acquis dans ce chapitre et le chapitre précédent, ont mis en lumière une spécialisation des tâches et soulèvent la possible présence d'un polyéthisme d'âge chez *V. velutina nigrithorax*. Cet aspect sera discuté dans la partie **II.B**. Également, l'hétérogénéité coloniale pour les deux substances sémiochimiques a été soulignée et sera discutée dans la partie **I.B.b**. Enfin, le dernier objectif de la thèse était d'étudier des facteurs qui pouvaient influencer cette hétérogénéité chimique. Dans cette optique, l'apport de certains acides gras (acides gras insaturés) sur la composition en CHCs a été analysé, afin de déterminer s'ils pouvaient modifier certains constituants de la signature chimique ; et si oui, lesquels. De même, leurs effets ont été étudiés selon l'âge des frelons testés (**Chapitre 4**). Les résultats ont confirmé que l'apport d'acide gras insaturés pouvait modifier le profil cuticulaire des frelons adultes, notamment des hydrocarbures insaturés (alcènes), mais pas celui des jeunes émergents. Cette étude a permis de souligner le rôle des acides gras insaturés comme précurseurs dans la voie de biosynthèse des CHCs insaturés et *in fine* démontrer que le régime alimentaire pourrait impacter la signature chimique des frelons. Ce chapitre sera discuté dans la partie **III**.

Ces quatre chapitres ont permis d'approfondir nos connaissances actuelles sur le système de communication chimique chez *V. velutina nigrithorax,* ainsi que sur son organisation sociale. Ces travaux ont apporté des données essentielles sur la biologie fondamentale de cette espèce, et permettent d'envisager de futures études expérimentales afin de mettre au point un piégeage sélectif grâce à des appâts phéromonaux.

Les objectifs de la thèse ayant été rappelés, les principaux résultats obtenus vont être discutés afin d'améliorer notre compréhension sur le performant système de communication chimique du frelon à pattes jaunes *V. velutina nigrithorax*, mais aussi de discuter des différentes perspectives scientifiques possibles suite à ces travaux de recherche.

III. **Un système de communication chimique dynamique**

A. Un signal d'alarme hétérogène

a. *En fonction de la caste*

Les travaux sur la composition chimique de la phéromone d'alarme en fonction de la caste des femelles (reines, fondatrices, gynes et ouvrières) ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité chimique chez ces dernières (**Chapitre 1**). Cette hétérogénéité chimique selon les castes avait été précédemment observée chez différentes espèces de fourmis (Bradshaw et al. 1979c; Do Nascimento et al. 1993; Hughes et al. 2001; Veloso Francelino et al. 2008) et chez les guêpes *Polistes dominulus* (Bruschini et al. 2008a). La première théorie émise pour expliquer cette différenciation chimique était que les différentes castes vivaient dans des environnements différents. Cependant, aucune preuve directe n'avait permis de confirmer cette théorie, d'autant plus que certaines fourmis du genre *Atta* pouvaient se retrouver à la fois à l'intérieur et à l'extérieur du nid. Une autre hypothèse, cette fois-ci évolutive, explique que chez les Hyménoptères, le dard était à l'origine un ovipositeur. La glande à venin reliée au dard, pourrait donc encore contenir des composés chimiques utilisés comme des phéromones sexuelles chez les individus fertiles pour attirer les mâles. Cela aurait pu être le cas chez le frelon à pattes jaunes, cependant, aucune attractivité des composés de la glande à venin envers les mâles n'a été mise en évidence (Cappa et al. 2019).

Les résultats obtenus suggèrent davantage que la composition de la glande à venin évolue en fonction du cycle biologique de l'individu. Effectivement, la composition de la

phéromone d'alarme est différente entre les gynes, les fondatrices et les reines. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les ouvrières et les gynes, confirmant ainsi l'évolution du signal d'alarme chez les femelles fertiles selon la période de l'année et l'état physiologique de ces femelles. La phéromone d'alarme pourrait être utilisée par les différentes castes pour transmettre différents messages et donc engendrer chez les congénères des réponses comportementales variables. En effet, il se pourrait que le signal émis par les reines soit spécifique à ces dernières, par exemple. Effectivement, ce signal, émis par la reine représentant l'individu indispensable à la survie de la colonie pourrait être différent et plus effectif qu'un signal d'alarme émis par les nombreuses ouvrières de la colonie. Il se pourrait également que différents facteurs modifient la composition de la glande à venin. Suite à la copulation chez les gynes, l'apport de spermatozoïdes et de fluides séminaux des mâles pourraient modifier la production des différents composés de leur phéromone d'alarme pour l'amener à celle des fondatrices. En effet, il a été démontré chez l'abeille *Apis mellifera*, que l'insémination artificielle de sperme provoquait des modifications de la composition chimique des glandes mandibulaires chez les reines (Richard et al. 2007). Également, la première ponte par les fondatrices, ou des signaux particuliers émis par les nouvelles ouvrières pourraient encore modifier leur phéromone d'alarme pour correspondre à celle des reines. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour identifier et analyser les facteurs et les mécanismes physiologiques pouvant participer à cette modification de la composition de la phéromone d'alarme.

b. *En fonction de l'âge*

Cette thèse a également souligné la dynamique chimique de la phéromone d'alarme en fonction de l'âge des individus (**Chapitre 2**). Contrairement à nos attentes, la majorité des composés de cette phéromone sont présents dès l'émergence, à l'exception d'un composé, le cyclohexanol. Toutefois, la proportion de certains composés est moins importante chez les

émergents que chez les adultes. Étant donné que les frelons ne semblent pas capables de piquer les premiers jours (absence de comportement d'agressivité), l'absence d'une grande partie, voire de la totalité de la phéromone d'alarme était envisagée. De fait, soit un certain temps est nécessaire pour mettre en place la voie de biosynthèse de certains composés chimiques de la phéromone, soit les frelons émergents utilisent la phéromone d'alarme comme un moyen de communication qui leur serait spécifique. Des études à la fois comportementales et biochimiques sont cependant nécessaires pour résoudre cette question.

Les résultats ont également souligné que cette phéromone évoluait lentement au cours du temps. Effectivement, la composition de la phéromone d'alarme était différente entre les individus juste après leur émergence au stade adulte (moins de 24 heures), 6 jours après (entre 144 et 168 heures) et les individus considérés comme âgés (ouvrières en activité dans le nid, d'âges inconnus et capturées à l'extérieur du nid) (**Chapitre 2**). Il serait donc intéressant d'étudier à partir de quel moment le mélange chimique de la glande à venin joue le rôle d'un signal d'alarme et si celui-ci arrête d'évoluer à un âge donné ou s'il se modifie tout le long de la vie des ouvrières. Des analyses sont encore menées à ce jour sur le plus long terme et sont en cours d'analyse. Toutefois, il est probable que cette dynamique ait lieu tout au long de la vie du frelon. En effet, les résultats obtenus chez les différents types d'ouvrières révèlent une spécialisation chimique en fonction de l'activité qu'elles accomplissent au sein de la colonie (**Chapitre 3**). Comme démontré chez les fourmis, il est donc possible que la composition de la phéromone d'alarme, son émission ainsi que sa perception soit différente en fonction de l'âge et de la tâche des ouvrières (Veloso Francelino et al. 2008; Pokorny et al. 2020). L'ensemble des résultats obtenus au cours des chapitres 1, 2 et 3, ont ainsi souligné la dynamique de la phéromone d'alarme en fonction du stade biologique et de l'âge des frelons, à la fois pour les femelles fertiles (gynes, fondatrices, reines) et stériles (ouvrières). Il serait intéressant dans

l'avenir d'étudier l'émission et la perception de cette phéromone chez les frelons à différents âges, afin d'obtenir des données comportementales sur son ou ses rôles potentiels.

B. L'importance des signaux de reconnaissance

a. *Une acquisition rapide de la signature chimique*

Reconnaître les congénères des intrus est essentiel au bon fonctionnement de la colonie (Hefetz 2007). Les travaux menés sur la signature chimique en fonction de l'âge ont démontré que le profil cuticulaire des frelons était acquis au bout de 48 heures contrairement à la phéromone d'alarme (**Chapitre 2**). Cette acquisition rapide du profil cuticulaire avait aussi été démontrée chez un autre Vespidé, les guêpes *Polistes fuscatus* (Panek et al. 2001). Ces résultats soulignent donc l'importance de la reconnaissance des congénères dans le système de communication chimique chez *V. velutina nigrithorax*. Effectivement, la proportion d'alcanes branchés correspondant aux CHCs impliqués dans les signaux de reconnaissance (Dani et al. 2001; Lucas et al. 2004; Blomquist and Ginzel 2021) augmente rapidement afin de correspondre à la signature des individus plus âgés (ouvrières). Acquérir rapidement les odeurs permettant d'être reconnu par les membres de la colonie est, en effet, primordial pour ne pas être rejeté par ces derniers (Lorenzi et al. 2004; Hefetz 2007).

Toutefois, l'analyse des différents types d'ouvrières, en fonction de leur activité dans la colonie (**Chapitre 3**), a permis de mettre en avant une dynamique de la signature chimique au stade adulte, démontrant ainsi, que même si le profil cuticulaire est acquis pendant les 48 premières heures après l'émergence, il peut varier ultérieurement. Le profil chimique des insectes peut en effet être modifié par différents facteurs intrinsèques (Darrouzet et al. 2014; Vernier et al. 2020) et extrinsèques (Rouault et al. 2001). Le rôle par exemple de l'hormone juvénile sur la voie de biosynthèse des CHCs serait intéressant à analyser au niveau moléculaire (niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse des CHCs

ou des protéines de transport hémolymphatiques des CHCs, activation/inactivation des enzymes…). De nombreuses études peuvent s'envisager pour analyser ces aspects de régulation de la production de la signature chimique.

b. *La spécialisation chimique coloniale*

Malgré un phénomène de dépression de consanguinité (Darrouzet et al. 2015b), les frelons à pattes jaunes présentent une odeur cuticulaire hétérogène en fonction de leur origine coloniale (Gévar et al. 2017). Ces résultats ont également été confirmés au cours du **chapitre 3** de cette thèse. Cette forte hétérogénéité coloniale souligne l'importance chez les frelons, de se différencier les uns des autres. Comme expliqué dans l'introduction, le modèle Gestalt suggère que les membres d'une colonie s'échangent des CHCs afin d'acquérir et de maintenir une odeur coloniale uniforme chez tous les membres de la colonie (Crozier and Dix 1979). C'est pourquoi, au cours de cette thèse, l'acquisition de la signature chimique a été étudiée en présence de congénère et/ou de matériaux du nid (**Chapitre 2**). Précédemment, il a été démontré qu'au sein des nids de frelons à pattes jaunes, les différentes structures possédaient des hydrocarbures similaires à ceux présents sur la cuticule des frelons (Haouzi et al. 2021). Une hétérogénéité chimique des nids en fonction des différentes structures le constituant (galettes, piliers, enveloppe) ainsi qu'une signature coloniale ont été mise en évidence dans cette étude (*Annexe*). Ces résultats pouvaient suggérer l'implication des nids dans l'acquisition de l'odeur coloniale, comme cela avait été précédemment démontré chez les fourmis grâce à l'utilisation de tubes d'élevage « souillés » (Crosland 1989). Néanmoins, malgré quelques tendances non significatives, les résultats ne mettent pas en évidence de phénomènes d'acquisition de l'odeur coloniale par l'environnement social. Une étude précédente chez un Vespidé démontrait un phénomène d'absorption des CHCs grâce à une exposition directe d'alcanes sur du papier filtre chez des guêpes âgées de moins de 24 heures (Lorenzi et al. 2004). Il est possible que pareillement, une exposition directe à des CHCs aurait mis en avant un phénomène

d'acquisition de ces composés chez le frelon à pattes jaunes. Également, il est possible qu'au cours de cette étude, l'environnement social n'était pas suffisamment représentatif des conditions naturelles et temporelles. Tout d'abord, il était très difficile de maintenir des individus vivants au laboratoire sur des semaines. De plus, les conditions expérimentales ne permettaient pas de maintenir une activité coloniale naturelle. Les frelons retirés des nids et placés dans des boites d'élevage, n'avaient plus d'accès à l'extérieur et les comportements naturels étaient alors altérés. De même, les tentatives pour maintenir en laboratoires des colonies complètes ont montré une modification du comportement des frelons avec une baisse importante de leurs activités. Ainsi, les frelons ne présentaient plus d'activités comportementales semblables à celles en conditions naturelles. C'est pourquoi, cet aspect a pu impacter les résultats de notre étude. Il est donc fort probable qu'avec des conditions plus représentatives de l'environnement naturel pendant une période plus longue, l'acquisition de l'odeur coloniale aurait pu davantage se réaliser grâce à l'environnement social. En effet, les observations en laboratoire ont malgré tout permis d'identifier des comportements de trophallaxie et de toilettage, suggérant ainsi que les CHCs pouvaient être échangés entre les individus, comme c'est le cas chez les fourmis (Soroker et al. 1994; Dahbi et al. 1999; Lahav et al. 2001; LeBoeuf et al. 2016). Toutefois, en l'absence de modèle chimique (présence d'une ouvrière et/ou d'un morceau de nid), l'augmentation des alcanes branchés chez les jeunes individus a été observée pour ressembler à la signature chimique des adultes. Ces résultats suggèrent donc que des facteurs intrinsèques pourraient être responsables de ces changements comme par exemple le microbiote intestinal (García-Roa et al. 2022) ou des régulations hormonales (Wicker-thomas and Jallon 1995; Holze et al. 2021). Néanmoins, l'analyse de ces facteurs est nécessaire pour confirmer ce point.

Également, les travaux de cette thèse ont permis de démontrer une forte signature coloniale de la phéromone d'alarme (**Chapitre 3**). Des différences intercoloniales avaient aussi

été mises en évidence chez les fourmis (Bradshaw et al. 1979c; Hughes et al. 2001). Ces dernières étaient davantage agressives lorsque les composés d'alarme émis ne provenaient pas des membres de leur colonie (Whitehouse and Jaffe 1995), suggérant ainsi un rôle dans la reconnaissance des congénères, où les différences chimiques coloniales peuvent être perçues par les individus. La composition coloniale de la phéromone d'alarme produite dans la glande à venin chez *V. velutina nigrithorax* pourrait donc être utilisée comme phéromone de reconnaissance, et participer à des phénomènes de reconnaissance de l'origine coloniale des individus. De nouvelles études comportementales sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. De plus, ces résultats peuvent aussi suggérer que la phéromone d'alarme pourrait être utilisée comme un marquage afin de limiter la compétition intra espèce entre les individus de différentes colonies. En effet, il a été démontré chez les abeilles *Apis mellifera*, que le 2-heptanone pouvait être déposé sur les fleurs comme un signal de marquage afin de repousser les autres abeilles butineuses (Vallet et al. 1991; Giurfa 1993). Il est donc possible que les frelons utilisent la phéromone d'alarme pour marquer des ressources alimentaires (ruchers par exemple) ou des ressources végétales nécessaires à la construction de leur nid. Effectivement, ce phénomène de marquage a déjà été démontré chez le frelon géant *Vespa mandarinia* où il émet des composés issus de la glande à venin et frotte sa glande van der Vecht sur le nid des proies afin de recruter des congénères (Ono et al. 1995, 2003; Cappa et al. 2021). Des études comportementales et de suivi des fourrageuses seraient à envisager pour étudier ces points chez *V. velutina nigrithorax*.

La spécialisation chimique coloniale des frelons est donc très présente dans leur système de communication. Toutefois, cela ne semble pas être un frein à leur succès invasif. Il a été démontré que les frelons de différentes colonies pouvaient chasser devant un même rucher (Bouzar et al. 2022), et donc qu'ils pouvaient se tolérer. Cette tolérance a aussi été mise en évidence lors d'expériences comportementales préliminaires en laboratoire. Effectivement, les

frelons issus de 2 colonies différentes présentaient la plupart du temps peu ou pas de comportements agressifs. Cette capacité de tolérer les individus d'une même espèce, mais ayant des variabilités coloniales pourrait donc être l'un des facteurs clés au succès invasif de cette espèce, comme ça a été montré chez d'autres espèces d'insectes eusociaux invasifs, tels que la fourmi d'Argentine *Linepithema humile* (Brandt et al. 2009) et le termite *Reticulitermes flavipes* (Perdereau et al. 2010, 2011). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cet aspect.

IV. **La spécialisation chimique des ouvrières**

A. Une organisation sociale élaborée

Les observations menées sur le terrain, ont permis d'identifier 4 types de comportements chez les ouvrières correspondant à des activités différentes. Parmi elles, se distinguaient les bâtisseuses qui construisent le nid, les gardiennes qui protègent la colonie en attaquant un stimulus visuel agité devant la colonie, ainsi que deux types de fourrageuses. Les fourrageuses dites « animales » (FA) correspondant aux ouvrières qui ramènent à la colonie des boulettes de proies animales afin de nourrir les larves et les frelons à l'intérieur du nid (Matsuura and Yamane 1990). Les fourrageuses dites « matériaux » (FM) correspondant quant à elles, aux ouvrières qui rapportent des boulettes de fibres végétales mélangées à de la salive afin de construire le nid.

Pour chaque type d'ouvrière, la signature chimique (CHCs) et la phéromone d'alarme ont été analysées (**Chapitre 3**). Dans les deux cas, une spécialisation chimique des ouvrières a été mise en évidence.

Tout d'abord, les résultats ont démontré que la composition chimique en alcanes de la signature chimique des ouvrières est similaire pour les FA, les bâtisseuses et les FM. Ces ouvrières, qui exercent des activités à l'extérieur de la colonie, sont probablement plus

impactées par les intempéries que les gardiennes qui restent à l'entrée du nid. Ces ouvrières auraient donc besoin d'un profil en alcanes spécifique afin de les protéger davantage contre les conditions environnementales changeantes, comme cela a été démontré chez les fourmis (Wagner et al. 1998, 2001).

Toutefois, les résultats acquis au cours de cette étude n'ont pas souligné de différences chimiques claires entre les bâtisseuses, les gardiennes et les FM. Les observations comportementales sur le terrain suggéraient que les bâtisseuses et les FM pouvaient correspondre aux mêmes individus. De la même manière que chez les guêpes sociales *Vespula Koreensis* (Kim et al. 2012), il arrivait que des FM, une fois de retour à la colonie, se mettaient directement sur la surface du nid pour le construire. L'ensemble des résultats sur les CHCs laisse penser que ces trois types d'ouvrières pourraient correspondre aux mêmes individus, ou bien que ces ouvrières ne nécessitent pas de profil cuticulaire spécifique. Il est donc possible que ces activités soient réalisées par le même type d'ouvrière, et qu'en fonction des besoins de la colonie, elles puissent changer d'activité. Chez les guêpes *Polybia aequatorialis*, l'échange de tâches entre les FA et les FM est rare mais présent (O'Donnell and Jeanne 1990). Des études comportementales et de suivi des individus seraient intéressantes à mener afin de déterminer si les bâtisseuses, gardiennes et les FM peuvent passer d'une activité à l'autre selon les besoins.

Une nette spécialisation chimique des FA par rapport aux autres ouvrières a été observée. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que les FA possèdent plus d'alcènes par rapport aux autres ouvrières. Ces CHCs qui sont impliqués dans la reconnaissance des congénères (Dani et al. 2001), pourraient ainsi permettre à ces ouvrières d'être perçues comme des individus exerçant cette activité et d'être reconnues par les gardiennes afin de ne pas être attaquées. La spécialisation chimique des fourrageuses selon leurs tâches (collecte de proies ou de matériaux de construction) a également été observé chez les guêpes *Polybia aequatorialis,*

où deux types de fourrageuses se distinguent, celles de types proies (FA) et celles de types matériaux (FM) (O'Donnell and Jeanne 1990).

Une spécialisation chimique de la phéromone d'alarme en fonction de l'activité des ouvrières a également été observée. À nouveau, une séparation chimique des FA a été trouvée. Cependant, contrairement à l'étude sur la signature chimique, les bâtisseuses se distinguent chimiquement des autres ouvrières. Pour ces dernières, il est possible qu'elles utilisent leur phéromone d'alarme comme un message spécifique pour la colonie, afin de localiser un défaut ou une zone abîmée sur le nid et permettre ainsi le recrutement de congénères pour réparer ce dernier. En effet, cette phéromone peut aussi servir de signal de marquage, comme cela a été démontré chez l'abeille afin de marquer des ressources florales (Vallet et al. 1991; Giurfa 1993), et chez les frelons *Vespa mandarinia* pour maquer un site de fourragement et ainsi recruter des congénères (Ono et al. 1995, 2003; Cappa et al. 2021). Il est donc envisageable que cette phéromone soit utilisée chez des Vespidés, comme le frelon *V. velutina nigrithorax*, comme un signal de marquage, mais cette fois-ci sur le nid, pour aider à son entretien. Le marquage des nids à l'aide d'hydrocarbures a été démontré chez des fourmis (Lenoir et al. 2009), et chez le frelon à pattes jaunes (Haouzi et al. 2021) (*Annexe*). Néanmoins, des études complémentaires seraient à mener afin d'analyser un possible marquage chimique du nid avec les composants de la phéromone d'alarme suite à son altération, tout comme des études comportementales sur les bâtisseuses.

Les résultats de ce chapitre mettent donc en avant une spécialisation chimique des ouvrières pour les deux phéromones, avec une nette séparation des FA. Les données chimiques obtenues semblent indiquer que les FM et les gardiennes correspondraient aux mêmes individus. Toutefois, la différenciation chimique des bâtisseuses par rapport à ces deux dernières n'est pas perceptible pour leur profil cuticulaire contrairement à la phéromone d'alarme. Globalement, l'ensemble de nos résultats souligne le fait que les ouvrières frelons se

distingueraient chimiquement en 2 groupes : les FA et les autres. Pour expliquer ces différences, des études complémentaires sont nécessaires afin de trouver les facteurs biotiques et/ou abiotiques à leur origine.

B. Un potentiel polyéthisme d'âge

Comme discuté dans la partie précédente, le chapitre 3 met en évidence une différenciation chimique de certaines ouvrières en fonction de leur activité à un instant donné. Ces travaux, ont également permis de déterminer des CHCs discriminants les groupes d'ouvrières (**Chapitre 3**). Parmi eux, le 3-MeC27 était un biomarqueur chimique du groupe incluant les bâtisseuses, les gardiennes et les FM. Ce composé chimique présent chez des guêpes nouvellement émergées (Kühbandner et al. 2013), suggère que les ouvrières frelons exerçant ces activités, pourraient correspondre aux individus les plus jeunes, et ainsi, les FA correspondraient aux ouvrières les plus âgées. Le 3Me-C23, connu pour être un indicateur d'âge chez les Diptères (Moore et al. 2016), a été identifié chez les FA comme étant un composé discriminant. Il pourrait donc être considéré comme un indice chimique concernant leur âge.

Le polyéthisme d'âge est un comportement adaptatif que l'on retrouve chez certaines espèces eusociales où les jeunes ouvrières effectuent des tâches peu coûteuses et comportant moins de risques, contrairement aux plus âgées qui feraient des activités plus dangereuses comme aller fourrager et de fait être soumises à la prédation (Goldsby et al. 2012). Chez les abeilles mellifères, la DOL (correspondant au terme anglais « Division of labour ») est corrélée à l'âge des ouvrières (Johnson 2008). Elles commencent par effectuer des tâches à l'intérieur de la colonie, comme le soin au couvain par exemple, puis finissent, lorsqu'elles sont plus âgées, à aller collecter des ressources alimentaires loin de la protection de la colonie (Robinson 1992). Des différences chimiques entre les individus effectuant des tâches à l'intérieur de la colonie comparées à ceux exerçant des tâches à l'extérieur peuvent être mises en évidence (Rahman et al. 2016; Vernier et al. 2019). Contrairement à nos hypothèses de départ, deux types

de fourrageuses se distinguent chimiquement. De plus, les FA se distinguent de toutes les autres ouvrières. Il est donc probable que chez le frelon, les FA correspondent aux individus les plus âgés, car ce sont elles qui prennent le plus de risque en allant chercher des proies, à priori éloignées de la colonie. Ainsi, elles auraient plus de risque d'être elles-mêmes les proies de prédateurs divers comme des oiseaux. Une différenciation entre deux types de fourrageuses avait également été soulignée chez les guêpes *Vespula koreensis*, où les fourrageuses de proies et de nectar étaient plus âgées que les fourrageuses de pulpe (Kim et al. 2012). Par conséquent, il est possible que l'emplacement des nids soit choisi en fonction de la proximité de ressources végétales, et non pas de ressources alimentaires afin de diminuer le risque de prédation sur les jeunes individus (FM). Cette question de choix concernant la localisation du nid à proximité d'éléments d'intérêt a été observée chez des fourmis. Les colonies de fourmis *Iridomyrmex purpureus* (Van Wilgenburg and Elgar 2007) et *Linepithema humile* (Holway and Case 1999) présentent des préférences de nidification, notamment en se localisant près de ressources alimentaires. Toutefois, aucune étude à ce jour n'a apporté de données de terrains sur cette question chez le frelon à pattes jaunes.

V. **L'impact du régime alimentaire sur la communication chimique**

Pour terminer, l'alimentation des individus peut aussi être un paramètre important. Pour aborder cette question, l'impact d'un apport en acides gras insaturés, et cela, en fonction de l'âge des frelons a été analysé (**Chapitre 4**). Les principaux résultats ont montré que cet apport entraînait une modification de la signature chimique des frelons au stade adulte. Aucun effet, n'a cependant été démontré sur le profil cuticulaire des jeunes adultes émergents âgés de moins de 24 heures. Cette étude a donc permis de mettre en avant le possible rôle des acides gras insaturés en tant que précurseurs dans la voie de biosynthèse des alcènes qui constitueront une partie des CHCs au stade adulte. Il est ainsi possible que les acides gras ingérés par les frelons puissent rejoindre les œnocytes du tégument abdominal, le site de production des CHCs (Fan

et al. 2003). Il a été démontré chez la drosophile, que le gène Désaturase 1 (desat1) pourrait jouer un rôle dans le métabolisme des lipides et la production d'hydrocarbures grâce à l'utilisation d'acides gras tels que les acides palmitique et stéarique (Wicker-Thomas and Chertemps 2010). Il est donc cohérent que l'apport d'acides gras insaturés dans notre expérience puisse ainsi impacter le profil cuticulaire des frelons, notamment celui en alcènes. Toutefois, les modifications observées ne concernent que les ouvrières adultes âgées, et non pas les émergents. Les voies de biosynthèse pourraient donc réagir différemment à cet apport en acides gras insaturés selon l'âge des individus. Des études complémentaires sur ces voies de biosynthèse sont à envisager pour mieux comprendre leur fonctionnement vis-à-vis de facteurs biotiques et abiotiques pouvant modifier la production en CHCs. Également, ces résultats suggèrent que l'apport d'acides gras insaturés via le régime alimentaire pourrait probablement modifier la signature chimique des frelons. Ces molécules passeraient la barrière intestinale pour rejoindre l'hémolymphe (site d'injection expérimentale des acides gras) pour finalement êtres captés par les oenocytes afin d'entrer en tant que substrats dans la voie de biosynthèse des CHCs. Ce résultat a été démontré chez les fourmis, où leur signature chimique était modifiée par le régime alimentaire et provoquait ainsi l'altération des signaux de reconnaissance (Liang and Silverman 2000; Buczkowski et al. 2005). Les alcènes étant principalement utilisés dans les phénomènes de reconnaissance (Dani et al. 2001), toute modification de ceux-ci pourrait induire des changements dans le comportement social des frelons, et *in fine* affecter leur organisation sociale. Il n'est pas exclu qu'un apport différentiel en acides gras participe à l'origine des différences chimiques observées entre les ouvrières selon leur âge (**Chapitre 2**) et entre les ouvrières (**Chapitre 3**), mais des analyses plus approfondies concernant le régime alimentaire de *V. velutina nigrithorax* sont nécessaires pour étudier ce point.

Conclusion

“Dans la vie, rien n’est à craindre, tout est à comprendre.”

Marie Curie

Dans son ensemble, ces travaux de thèse ont permis d'améliorer notre compréhension sur le système de communication chimique employé chez le frelon à pattes jaunes *V. velutina nigrithorax* (*Figure 11*). Cette communication, basée sur les CHCs et la phéromone d'alarme, est une composante majeure au maintien et à la survie coloniale. Nos études ont permis d'éclaircir la composition de la phéromone d'alarme chez les femelles, mais également d'étudier sa dynamique ainsi que celle de la signature chimique en fonction de l'âge des individus. Une acquisition rapide des profils cuticulaires a été mise en évidence comparée à la phéromone d'alarme. Également, la compréhension de l'organisation sociale du frelon à pattes jaunes a été approfondie avec la spécialisation chimique des ouvrières en fonction de l'activité qu'elles effectuent au sein de la colonie, mettant ainsi en lumière une division du travail élaborée avec une spécialisation des tâches et un potentiel polyéthisme d'âge. Une forte signature coloniale a également été révélée pour la phéromone d'alarme. Enfin, l'impact d'un apport acides gras insaturés sur la signature chimique des adultes a été démontré. Des acides gras insaturés pourraient servir de précurseurs dans la voie de biosynthèse des CHCs, notamment des alcènes (molécules clés dans les phénomènes de reconnaissances interindividuelles) au stade adulte. Toutefois, cet effet serait différent selon l'âge des individus. Également, ces résultats ont permis d'envisager le possible effet du régime alimentaire sur les signaux de reconnaissance et *in fine* son impact sur l'organisation sociale des frelons.

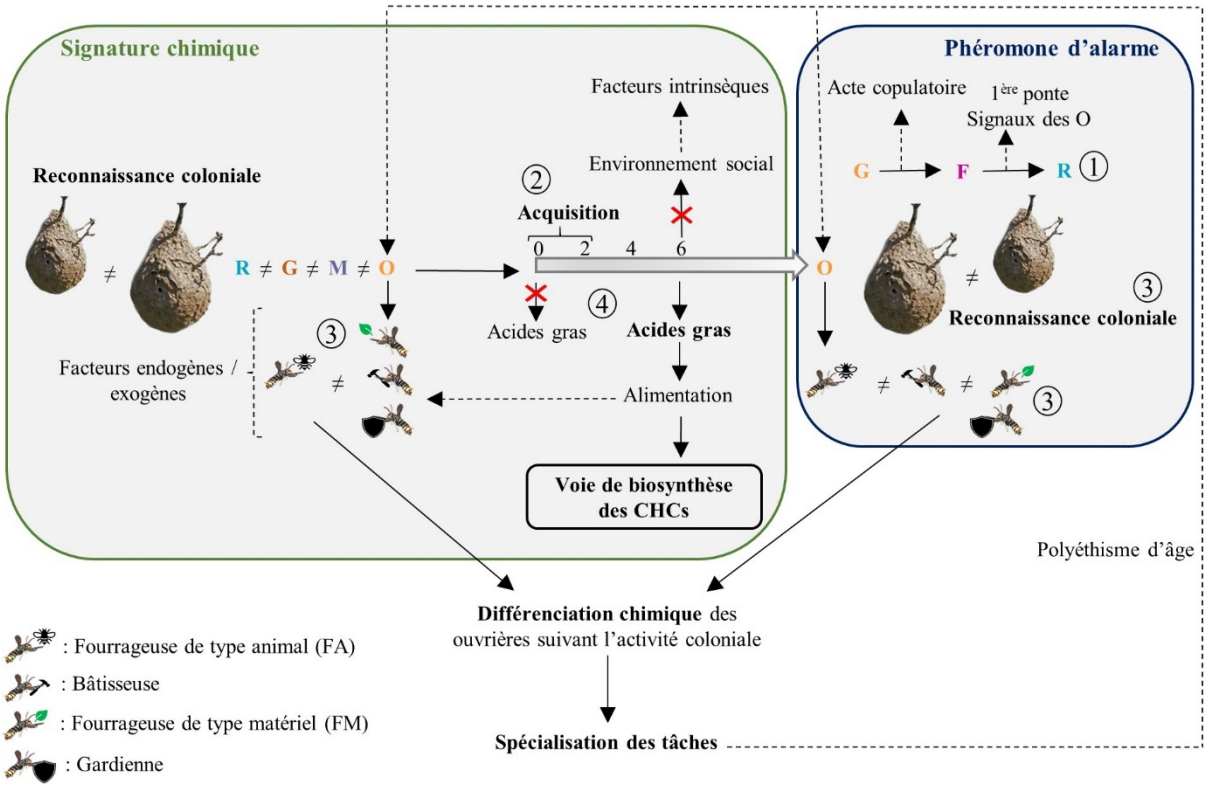


Figure 11. Schéma récapitulatif concernant le système de communication chimique du frelon à pattes jaunes, *Vespa velutina nigrithorax,* impliquant la signature chimique (CHCs) et la phéromone d'alarme. Les principaux résultats acquis au cours de la thèse ainsi que les perspectives d'études sont représentés sur cette figure. Les lettres R, F, G, M et O correspondent respectivement aux reines, fondatrices, gynes, mâles et ouvrières. Les différences de couleur chez ces derniers indiquent des différences chimiques. Les flèches en pointillés correspondent aux perspectives envisagées, et les flèches pleines aux principaux résultats acquis au cours des chapitres, qui sont représentés quant à eux par des cercles numérotés.

De manière générale, cette thèse a permis d'acquérir de nombreuses données expérimentales sur deux substances sémiochimiques du frelon *V. velutina nigrithorax*. Celles-ci nous permettent de mieux comprendre cette espèce et d'envisager de nouvelles études expérimentales dans le but de contrôler son invasion. En effet, les techniques de piégeages actuelles contre ce frelon invasif utilisent toutes des appâts alimentaires (Rome et al. 2011; Sánchez and Arias 2021) qui ont démontré une efficacité assez relative. L'utilisation à la place de ces appâts alimentaires, d'un appât phéromonal est une approche qui a démontré son intérêt chez de nombreux insectes (Ahmad and Kamarudin 2011). Néanmoins, nos résultats semblent indiquer que trouver un appât phéromonal utilisant les signaux d'alarme s'avère difficile chez le frelon, compte tenu de leur dynamique chimique au cours du cycle biologique et de l'âge des

ouvrières, mais aussi en raison d'une forte signature coloniale. Des expériences de laboratoire et de terrain sont déjà envisagées afin de déterminer une utilisation potentielle de cette phéromone comme appât dans une stratégie de contrôle de *V. velutina nigrithorax* en Europe.

Indépendamment d'études appliquées, l'analyse des CHCs a permis de mieux comprendre l'organisation sociale du frelon et l'acquisition de ses signaux de reconnaissances. Ces travaux apportent de nouvelles perspectives concernant des études comportementales sur la présence du modèle Gestalt, ainsi qu'un possible polyéthisme d'âge. Dans cette optique, les résultats acquis indiquent aussi la possibilité d'autres fonctions de la phéromone d'alarme, autres que le recrutement de congénères pour la défense de la colonie. L'impact de facteurs extrinsèques (conditions environnementales) ou intrinsèques (régulation hormonale, microbiote) sur l'organisation sociale est aussi à étudier pour aller plus loin dans la compréhension de ces systèmes de communications chez ces insectes eusociaux.

Références Bibliographiques

A

Abd El-Ghany NM (2020) Pheromones and Chemical Communication in Insects. Pests, Weeds Dis Agric Crop Anim Husb Prod. https://doi.org/10.5772/intechopen.92384

Ahmad SN, Kamarudin N (2011) Pheromone trapping in controlling key insect pests: Progress and prospects. 62:12–24

Akino T (2008) Chemical strategies to deal with ants: a review of mimicry, camouflage, propaganda, and phytomimesis by ants (Hymenoptera: Formicidae) and other arthropods. Myrmecological News 11:173–181

Alaux C, Robinson GE (2007) Alarm pheromone induces immediate-early gene expression and slow behavioral response in honey bees. J Chem Ecol 33:1346–1350. https://doi.org/10.1007/s10886-007-9301-6

Aldrich JR, Oliver JE, Taghizadeh T, et al (1999) Pheromones and colonization: Reassessment of the milkweed bug migration model (Heteroptera: Lygaeidae: Lygaeinae). Chemoecology 9:63–71. https://doi.org/10.1007/s000490050035

Allan SA, Slessor KN, Winston ML, King GGS (1987) The influence of age and task specialization on the production and perception of honey bee pheromones. J Insect Physiol 33:917–922. https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90003-5

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

Arndt U (1995) Air pollutants and pheromones - A problem? Chemosphere 30:1023–1031. https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00013-X

Aron S, Passera L (2009) Les degrés de la socialité. In: Les sociétés animales. pp 53–59

Ascunce MS, Yang CC, Oakey J, et al (2011) Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*. Science (80-) 331:1066–1068. https://doi.org/10.1126/science.1198734

B

Bagnères AG, Blomquist GJ (2010) Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons. In: Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology. pp 75–99

Bagnères AG, Rivière G, Clement JL (1998) Artificial neural network modeling of caste odor discrimination based on cuticular hydrocarbons in termites. Chemoecology 8:201–209. https://doi.org/10.1007/s000490050026

Basu S, Clark RE, Fu Z, et al (2021) Insect alarm pheromones in response to predators: Ecological trade-offs and molecular mechanisms. Insect Biochem Mol Biol 128:. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103514

Beggs JR, Brockerhoff EG, Corley JC, et al (2011) Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. BioControl 56:505–526. https://doi.org/10.1007/s10526-011-9389-z

Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate : A practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc 57:289–300. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

Bertelsmeier C, Luque GM, Hoffmann BD, Courchamp F (2015) Worldwide ant invasions

under climate change. Biodivers Conserv 24:117–128. https://doi.org/10.1007/s10531-014-0794-3

Bertelsmeier C, Ollier S, Liebhold A, Keller L (2017) Recent human history governs global ant invasion dynamics. Nat Ecol Evol 1:0184

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

Berville L, Lucas C, Haouzi M, et al (2023) Chemical profiles of venom glands in queens, foundresses, pre-wintering gynes, and workers in the hornet *Vespa velutina nigrithorax*. Comptes rendus - Chim 26:1–16

Beshers SN, Fewell JH (2001) Models of division of labor in social insects. Annu Rev Ecol Evol Syst 46:413–440

Billen J (2009) Diversity and morphology of exocrine glands in ants. In: XIX Simposio de Mirmecologia. Ouro Preto, Brasil, p 21

Blight O, Berville L, Vogel V, et al (2012) Variation in the level of aggression, chemical and genetic distance among three supercolonies of the Argentine ant in Europe. Mol Ecol 21:4106–4121. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05668.x

Blomquist GJ, Bagnères AG (2010a) Insect hydrocarbons biology, biochemistry, and chemical ecology. Cambridge University Press, UK

Blomquist GJ, Bagnères AG (2010b) Structure and analysis of insect hydrocarbons. In: Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology. pp 19–34

Blomquist GJ, Ginzel MD (2021) Chemical Ecology, Biochemistry, and Molecular Biology of Insect Hydrocarbons. Annu Rev Entomol 66:45–60. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031620-071754

Blum MS (1969) Alarm Pheromones. Annu Rev Entomol 14:57–80

Blumenfeld AJ, Vargo EL (2020) Geography, opportunity and bridgeheads facilitate termite invasions to the United States. Biol Invasions 22:3269–3282. https://doi.org/10.1007/s10530-020-02322-5

Boake CRB (1984) Natural History and Acoustic Behavior of a Gregarious Cricket. Behaviour 89:241–250

Boch R, Shearer DA (1971) Chemical releasers of alarm behaviour in the honey-bee, *Apis mellifera* . J Insect Physiol 17:2277–2285. https://doi.org/10.1016/0022-1910(71)90077-1

Boch R, Shearer DA (1966) Iso-Pentyl Acetate in Stings of Honeybees of Different Ages. J Apic Res 5:65–70

Bonavita-Cougourdan A, Clement JL, Lange C (1993) Functional subcaste discrimination (foragers and brood-tenders) in the ant *Camponotus vagus* Scop.: Polymorphism of cuticular hydrocarbon patterns. J Chem Ecol 19:1461–1477. https://doi.org/10.1007/BF00984890

Bontonou G, Wicker-Thomas C (2014) Sexual Communication in the *Drosophila* Genus. Insects 5:439–458. https://doi.org/10.3390/insects5020439

Boullis A, Detrain C, Francis F, Verheggen FJ (2016) Will climate change affect insect pheromonal communication? Curr Opin Insect Sci 17:87–91. https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.08.006

Bouzar C, Bankhead-Dronnet S, Gévar J, Darrouzet E (2022) Chemical and genetic evidences that multiple hornet colonies attack honeybee colonies. Insectes Soc 69:159–168. https://doi.org/10.1007/s00040-022-00853-9

Bradbury JW, Vehrencamp SL (2011) Principles of ANIMAL COMMUNICATION, Second Edi

Bradshaw JWS, Baker R, Howse PE (1979a) Multicomponent alarm pheromones in the mandibular glands of major workers of the African weaver ant, *Oecophylla longinoda*.

Physiol Entomol 4:15–25. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1979.tb00173.x
Bradshaw JWS, Baker R, Howse PE (1975) Multicomponent alarm pheromones of the weaver ant. Nature 258:230–231. https://doi.org/10.1038/258230a0
Bradshaw JWS, Baker R, Howse PE (1979b) Chemical composition of the poison apparatus secretions of the African weaver ant, *Oecophylla longinoda*, and their role in behaviour. Physiol Entomol 4:27–38. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1979.tb00175.x
Bradshaw JWS, Baker R, Howse PE, Higgs MD (1979c) Caste and colony variations in the chemical composition of the cephalic secretiow of the African weaver ant, *Oecophylla longinoda*. Physiol Entomol 4:27–38. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1979.tb00175.x
Brandt M, Van Wilgenburg E, Tsutsui ND (2009) Global-scale analyses of chemical ecology and population genetics in the invasive Argentine ant. Mol Ecol 18:997–1005. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04056.x
Breed MD, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ 3 (2004) Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees. Annu Rev Entomol 49:271–298
Brereton RG, Lloyd GR (2014) Partial least squares discriminant analysis: Taking the magic away. J Chemom 28:213–225. https://doi.org/10.1002/cem.2609
Brossut R (1996) Phéromones: la communication chimique chez les animaux, CNRS Editi
Bruneau E (2011) Le frelon asiatique, déjà là. Actu Api 55:1–6
Bruschini C, Cervo R, Dani FR, Turillazzi S (2007) Can venom volatiles be a taxonomic tool for *Polistes* wasps (Hymenoptera, Vespidae)? J Zool Syst Evol Res 45:202–205. https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2006.00403.x
Bruschini C, Cervo R, Protti I, Turillazzi S (2008a) Caste differences in venom volatiles and their effect on alarm behaviour in the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ). J Exp Biol 211:2442–2449. https://doi.org/10.1242/jeb.017749
Bruschini C, Cervo R, Turillazzi S (2010) Chapter Nineteen - Pheromones in Social Wasps. In: Vitamins & Hormones, Volume 83
Bruschini C, Cervo R, Turillazzi S (2008b) Nesting habit and alarm pheromones in *Polistes gallicus* (Hymenoptera, Vespidae). J Insect Behav 21:123–129. https://doi.org/10.1007/s10905-007-9111-2
Bruschini C, Dani FR, Pieraccini G, et al (2006) Volatiles from the venom of five species of paper wasps (*Polistes dominulus, P. gallicus, P. nimphus, P. sulcifer* and *P. olivaceus*). Toxicon 47:812–825. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.03.002
Buczkowski G, Kumar R, Suib SL, Silverman J (2005) Diet-related modification of cuticular hydrocarbon profiles of the argentine ant, *Linepithema humile*, diminishes intercolony aggression. J Chem Ecol 31:829–843. https://doi.org/10.1007/s10886-005-3547-7
Budge GE, Hodgetts J, Jones EP, et al (2017) The invasion, provenance and diversity of *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae) in Great Britain. PLoS One 12:e0185172. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185172

C

Caliński T, Harabasz J (1974) A dendrite method for cluster analysis. Commun Stat Methods 3:1–27
Capinha C, Essl F, Seebens H, et al (2015) The dispersal of alien species redefines biogeography in the Anthropocene. Science (80-) 348:1248–1251. https://doi.org/10.1126/science.aaa8913
Cappa F, Cini A, Bortolotti L, et al (2021) Hornets and honey bees: A coevolutionary arms race between ancient adaptations and new invasive threats. Insects 12:1037.

https://doi.org/10.3390/insects12111037
Cappa F, Cini A, Pepiciello I, et al (2019) Female volatiles as sex attractants in the invasive population of *Vespa velutina nigrithorax*. J Insect Physiol 119:103952. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103952
Carpenter JM, Kojima J (1997) Checklist of the Species in the Subfamily Vespinae (Insecta: Hymenoptera: Vespidae). Nat Hist Bull Ibaraki Univ 1:51–92
Carrasco M, Montoya P, Cruz-López L, Rojas JC (2005) Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) to mango fruit volatiles. Environ Entomol 34:576–583
Châline N, Sandoz JC, Martin SJ, et al (2005) Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (*Apis mellifera*). Chem Senses 30:327–335. https://doi.org/10.1093/chemse/bji027
Chapman RF (2013) The insects: structure and function, Cambridge. New York
Cheng YN, Wen P, Dong SH, et al (2017) Poison and alarm: The Asian hornet *Vespa velutina* uses sting venom volatiles as an alarm pheromone. J Exp Biol 220:645–651. https://doi.org/10.1242/jeb.148783
Cheng YN, Wen P, Tan K, Darrouzet E (2022) Designing a sex pheromone blend for attracting the yellow-legged hornet (*Vespa velutina*), a pest in its native and invasive ranges worldwide. Entomol Gen. https://doi.org/10.1127/entomologia/2022/1395
Chung H, Carroll SB (2015) Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. BioEssays 37:822–830. https://doi.org/10.1002/bies.201500014
Costa JT (2018) The other insect societies: overview and new directions. Curr Opin Insect Sci 28:40–49. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.008
Costanzo K, Monteiro A (2007) The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. Proc R Soc B Biol Sci 274:845–851. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3729
Couvillon MJ, Ratnieks FLW (2008) Odour transfer in stingless bee marmelada (*Frieseomelitta varia*) demonstrates that entrance guards use an "undesirable-absent" recognition system. Behav Ecol Sociobiol 62:1099–1105. https://doi.org/10.1007/s00265-007-0537-5
Crall JD, de Bivort BL, Dey B, Versypt ANF (2019) Social buffering of pesticides in bumblebees: Agent-based modeling of the effects of colony size and neonicotinoid exposure on behavior within nests. Front Ecol Evol 7:. https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00051
Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P (2007) Social Immunity. Curr Biol 17:R693–R702. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008
Crosland MWJ (1989) Kin recognition in the ant *Rhytidoponera confusa* II. Gestalt odour. Anim Behav 37:920–926. https://doi.org/10.1016/0003-3472(89)90136-X
Crozier RH, Dix MW (1979) Analysis of Two Genetic Models for the Innate Components of Colony Odor in Social Hymenoptera. 4:217–224
Cunningham CB, Douthit MK, Moore AJ (2014) Octopaminergic gene expression and flexible social behaviour in the subsocial burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. Insect Mol Biol 23:391–404. https://doi.org/10.1111/imb.12090
Czaczkes TJ, Grüter C, Ratnieks FLW (2015) Trail pheromones: An integrative view of their role in social insect colony organization. Annu Rev Entomol 60:581–599. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020627

D

D'Ettorre P, Lenoir A (2010) Nestmate Recognition. In: Ant Ecology, Oxford bio. pp 194–209

da Silva RC, Brown RL, do Nascimento FS, et al (2021) Cuticular hydrocarbons as cues of caste and sex in the German wasp *Vespula germanica*. Insectes Soc 68:261–276. https://doi.org/10.1007/s00040-021-00817-5

Dahbi A, Hefetz A, Cerdá X, Lenoir A (1999) Trophallaxis mediates uniformity of colony odor in *Cataglyphis iberica* ants (Hymenoptera, Formicidae). J Insect Behav 12:559–567. https://doi.org/10.1023/A:1020975009450

Dalmon A, Gayral P, Decante D, et al (2019) Viruses in the invasive hornet *Vespa velutina*. Viruses 11:. https://doi.org/10.3390/v11111041

Danforth BN, Neff JL, Barretto-Ko P (1996) Nestmate relatedness in a communal bee, *Perdita texana* (Hymenoptera: Andrenidae), based on DNA fingerprinting. Evolution (N Y) 50:276–284. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb04491.x

Dani FR, Jones GR, Corsi S, et al (2005) Nestmate recognition cues in the honey Bee: Differential importance of cuticular alkanes and alkenes. Chem Senses 30:477–489. https://doi.org/10.1093/chemse/bji040

Dani FR, Jones GR, Destri S, et al (2001) Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. Anim Behav 62:165–171. https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1714

Darrouzet E (2019) Le frelon asiatique, un redoutable prédateur. Syndicat National d'Apiculture

Darrouzet E, Albouy V (2022) Les secrets de la communication animale, éditions Q

Darrouzet E, Gévar J, Dupont S (2015a) A scientific note about a parasitoid that can parasitize the yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax*, in Europe. Apidologie 46:130–132. https://doi.org/10.1007/s13592-014-0297-y

Darrouzet E, Gévar J, Guignard Q, Aron S (2015b) Production of Early Diploid Males by European Colonies of the Invasive Hornet *Vespa velutina nigrithorax*. PLoS One 10:1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136680

Darrouzet E, Labédan M, Landré X, et al (2014) Endocrine control of cuticular hydrocarbon profiles during worker-to-soldier differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes*. J Insect Physiol 61:25–33. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.12.006

David Morgan E (2009) Trail pheromones of ants. Physiol Entomol 34:1–17. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00658.x

Delaplane K, Hudson W, Johnson A, Berry J (2023) Yellow-Legged Hornet

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

Detrain C, Deneubourg JL (2006) Self-organized structures in a superorganism: do ants "behave" like molecules? Phys Life Rev 3:162–187. https://doi.org/10.1016/j.plrev.2006.07.001

Dhinaut J, Balourdet A, Teixeira M, et al (2017) A dietary carotenoid reduces immunopathology and enhances longevity through an immune depressive effect in an insect model. Sci Rep 7:1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12769-7

Dinno A (2017) Package 'dunn.test.' CRAN Repos 1–7

Do Nascimento RR, Morgan ED, Billen J, et al (1993) Variation with caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. J Chem Ecol 19:907–918. https://doi.org/10.1007/BF00992527

Drijfhout FP, Kather R, Martin SJ (2009) The role of cuticular hydrocarbons in insects. Behav Chem Ecol 91–114

Duarte A, Weissing FJ, Pen I, Keller L (2011) An Evolutionary Perspective on Self-Organized Division of Labor in Social Insects. Annu Rev Ecol Evol Syst 42:91–110. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145017

Duffield RM, Blum MS, Wheeler JW (1976) Alkylpyrazine alarm pheromones in primitive ants with small colonial units. Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem 54:439–440. https://doi.org/10.1016/0305-0491(76)90116-4

E

Edwards R (1980) Social wasps. Their biology and control. Rentokild Ltd, East Grinstead

Elgar MA, Zhang D, Wang Q, et al (2018) Insect antennal morphology: The evolution of diverse solutions to odorant perception. Yale J Biol Med 91:457–469

Endler A, Liebig J, Schmitt T, et al (2004) Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. Proc Natl Acad Sci U S A 101:2945–2950. https://doi.org/10.1073/pnas.0308447101

Esteves FG, Santos-Pinto JRA dos, Saidemberg DM, Palma MS (2017) Using a proteometabolomic approach to investigate the role of Dufour's gland in pheromone biosynthesis in the social wasp *Polybia paulista*. J Proteomics 151:122–130. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.009

Etges WJ, Veenstra CL, Jackson LL (2006) Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VII. Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. J Chem Ecol 32:2629–2646. https://doi.org/10.1007/s10886-006-9187-8

Evans TA, Forschler BT, Kenneth Grace J (2013) Biology of invasive termites: A worldwide review. Annu Rev Entomol 58:455–474. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153554

F

Fan Y, Chase J, Sevala VL, Schal C (2002) Lipophorin-facilitated hydrocarbon uptake by oocytes in the German cockroach *Blattella germanica* (L.). J Exp Biol 205:781–790. https://doi.org/10.1242/jeb.205.6.781

Fan Y, Zurek L, Dykstra MJ, Schal C (2003) Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German cockroach, *Blattella germanica*. Naturwissenschaften 90:121–126. https://doi.org/10.1007/s00114-003-0402-y

Farris SM, Robinson GE, Fahrbach SE (2001) Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. J Neurosci 21:6395–6404. https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-06395.2001

Fedina TY, Kuo T-H, Dreisewerd K, et al (2012) Dietary Effects on Cuticular Hydrocarbons and Sexual Attractiveness in *Drosophila*. PLoS One 7:. https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049799

Feener DH (1988) Effects of parasites on foraging and defense behavior of a termitophagous ant , *Pheidole titanis* Wheeler (Hymenoptera : Formicidae). Behav Ecol Sociobiol 22:421–427

Ferreira-Caliman MJ, Nascimento FS, Turatti IC, et al (2010) The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. J Insect Physiol 56:800–804. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.02.004

Fortunato A, Dani FR, Sledge MF, et al (2004) Alarm communication in *Ropalidia* social wasps. Insectes Soc 51:299–305. https://doi.org/10.1007/s00040-004-0744-2

Franklin DN, Brown MA, Datta S, et al (2017) Invasion dynamics of Asian hornet, *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae): a case study of a commune in south-west France. Appl Entomol Zool 52:221–229. https://doi.org/10.1007/s13355-016-0470-z

Fresneau D, Errard C (1994) L'identité coloniale et sa "représentation" chez les fourmis. Intellectica 19:91–115

Fujiwara-Tsujii N, Yamagata N, Takeda T, et al (2006) Behavioral responses to the alarm pheromone of the ant *Camponotus obscuripes* (Hymenoptera: Formicidae). Zoolog Sci 23:353–358. https://doi.org/10.2108/zsj.23.353

G

García-Roa R, Domínguez-Santos R, Pérez-Brocal V, et al (2022) Kin recognition in Drosophila: rearing environment and relatedness can modulate gut microbiota and cuticular hydrocarbon odour profiles. Oikos 2022:1–9. https://doi.org/10.1111/oik.08755

Geister TL, Lorenz MW, Hoffmann KH, Fischer K (2008) Adult nutrition and butterfly fitness: Effects of diet quality on reproductive output, egg composition, and egg hatching success. Front Zool 5:1–13. https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-10

Gévar J, Bagnères AG, Christidès JP, Darrouzet E (2017) Chemical Heterogeneity in Inbred European Population of the Invasive Hornet *Vespa velutina nigrithorax*. J Chem Ecol 43:763–777. https://doi.org/10.1007/s10886-017-0874-4

Gibbs A (1998) Water-Proofing Properties of Cuticular Lipids. Am Zool 38:471–482. https://doi.org/10.1093/icb/38.3.471

Gibbs A (2002) Lipid melting and cuticular permeability: New insights into an old problem. J Insect Physiol 48:391–400. https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00059-8

Gibbs A, Mousseau TA (1994) Thermal Acclimation and Genetic Variation in Cuticular Lipids of the Lesser Migratory Grasshopper (*Melanoplus sanguinipes*): Effects of Lipid Composition on Biophysical Properties. Physiol Zool 67:1523–1543. https://doi.org/10.1086/physzool.67.6.30163910

Ginzel MD, Blomquist GJ (2016) Insect hydrocarbons: biochemistry and chemical ecology. In: Extracellular Composite Matrices in Arthropods. Springer Cham, pp 221–252

Giurfa M (1993) The repellent scent-mark of the honeybee *Apis mellifera ligustica* and its role as communication cue during foraging. Insectes Soc 40:59–67. https://doi.org/10.1007/BF01338832

Goetsch W (1934) Untersuchungen über die zusammenarbeit im ameisenstaat. Zeitschrift für Morphol und Ökologie der Tiere 28:319–401

Goldarazena A, de Heredia IP, Romon P, et al (2015) Spread of the yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* du Buysson (Hymenoptera: Vespidae) across Northern Spain. EPPO Bull 45:133–138. https://doi.org/10.1111/epp.12185

Goldsby HJ, Serra N, Dyer F, et al (2012) The evolution of temporal polyethism. Artif Life 13:178–185. https://doi.org/10.7551/978-0-262-31050-5-ch025

Goodman WG, Cusson MLIG (2012) The juvenile hormones. In: Insect endocrinology, Academic P. pp 310–365

Gordon DM (2019) The ecology of collective behavior in ants. Annu Rev Entomol 64:35–50. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111923

Gordon DM (1996) The organization of work in social insect colonies. Nature 380:121–124

Greene MJ (2010) Cuticular hydrocarbon cues in the formation and maintenance of insect social groups. In: Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology. pp 244–254

Greene MJ, Gordon DM (2003) Cuticular hydrocarbons inform task decisions. Nature 423:32. https://doi.org/10.1038/423032a

Gronenberg W, Heeren S, Hölldobler B (1996) Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. J Exp Biol 199:2011–2019. https://doi.org/10.1242/jeb.199.9.2011

Grosso-silva JM, Maia M (2012) NOTA / NOTE *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Vespidae), new species for Portugal. Arq Entomoloxicos 6:53–54. https://doi.org/10.7764/onomazein.28.24

Guerrieri FJ, Nehring V, Jorgensen CG, et al (2009) Ants recognize foes and not friends. Proc R Soc B Biol Sci 276:2461–2468. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1860

H

Haight KL (2012) Patterns of venom production and temporal polyethism in workers of Jerdon's jumping ant, *Harpegnathos saltator*. J Insect Physiol 58:1568–1574. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.09.011

Hall M, Robinson D (2021) Acoustic signalling in Orthoptera. In: Advances in Insect Physiology. pp 1–99

Hamilton W (1964) The Genetical Evolution of Social Behaviour. II. J Theor Biol 7:17–52. https://doi.org/10.4324/9781315238975-14

Haouzi M, Gévar J, Khalil A, Darrouzet E (2021) Nest structures display specific hydrocarbon profiles: insights into the chemical ecology of the invasive yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*. Chemoecology 31:227–238. https://doi.org/10.1007/s00049-021-00343-7

Hartfelder K, Emlen DJ (2012) Endocrine Control of Insect Polyphenism. In: Insect Endocrinology. pp 464–522

Hartigan JA., Wong M. A. (1979) Algorithm AS 136 : A K-Means Clustering Algorithm. J R Stat Soc Ser C (Applied Stat 28:100–108

Haxaire J, Tamisier JP, Bouget JP (2006) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hym., Vespidae). Bull la Société Entomol Fr 111:194–194

Heath RR, Landolt PJ (1988) The isolation, identification and synthesis of the alarm pheromone of *Vespula squamosa* (Drury) (Hymenoptera: Vespidae) and associated behavior. Experientia 44:82–83. https://doi.org/10.1007/BF01960257

Hefetz A (2007) The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae) -- interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy. A review. Myrmecol News 10:59–68

Heiduk A, Brake I, Shuttleworth A, Johnson SD (2023) 'Bleeding' flowers of *Ceropegia gerrardii* (Apocynaceae-Asclepiadoideae) mimic wounded insects to attract kleptoparasitic fly pollinators. New Phytol 239:1490–1504. https://doi.org/10.1111/nph.18888

Heinze J (2004) Reproductive conflict in insect societies. Adv Study Behav 34:1–57

Hervé M (2022) Package ' RVAideMemoire '

Hervé M, Nicolè F, Lê Cao KA (2018) Multivariate Analysis of Multiple Datasets: a Practical Guide for Chemical Ecology. J Chem Ecol 44:215–234. https://doi.org/10.1007/s10886-018-0932-6

Hölldobler B (1995) The chemistry of social regulation: Multicomponent signals in ant societies. Proc Natl Acad Sci U S A 92:19–22. https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.19

Hölldobler B, Wilson EO (1990) The ants. Harvard University Press

Holtof M, Lenaerts C, Cullen D, Vanden Broeck J (2019) Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. Cell Tissue Res 377:397–414. https://doi.org/10.1007/s00441-019-03031-9

Holway DA, Case TJ (1999) Mechanisms of dispersed central-place foraging in polydomous colonies of the Argentine ant. Anim Behav 59:433–441. https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1329

Holway DA, Lach L, Suarez A V., et al (2002) The causes and consequences of ant invasions. Annu Rev Ecol Syst 33:181–233. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150444

Holze H, Schrader L, Buellesbach J (2021) Advances in deciphering the genetic basis of insect cuticular hydrocarbon biosynthesis and variation. Heredity (Edinb) 126:219–234. https://doi.org/10.1038/s41437-020-00380-y

Hora RR, Ionescu-Hirsh A, Simon T, et al (2008) Postmating changes in cuticular chemistry and visual appearance in *Ectatomma tuberculatum* queens (Formicidae: Ectatomminae). Naturwissenschaften 95:55–60. https://doi.org/10.1007/s00114-007-0287-2

Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. Annu Rev Entomol 50:371–393. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359

Howard RW, Howard CD, Colquhoun S (1995) Ontogenetic and environmentally induced changes in cuticular hydrocarbons of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae). Ann Entomol Soc Am 88:485–495. https://doi.org/10.1093/aesa/88.4.485

Howse P, Stevens JM, Jones OT (2013) Insect pheromones and their use in pest management, Springer S

Hughes WOH, Howse PE, Goulson D (2001) Mandibular gland chemistry of grass-cutting ants: Species, caste, and colony variation. J Chem Ecol 27:109–124. https://doi.org/10.1023/A:1005624101743

I

Imrit MA, Dogantzis KA, Harpur BA, Zayed A (2020) Eusociality influences the strength of negative selection on insect genomes. Proc R Soc B Biol Sci 287:. https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1512

J

Jackson LL, Bartelt RJ (1986) Cuticular hydrocarbons of *Drosophila virilis*. Insect Biochem 16:433–439. https://doi.org/10.1016/0020-1790(86)90056-9

Jacquin-Joly E, Merlin C (2004) Insect olfactory receptors: Contributions of molecular biology to chemical ecology. J Chem Ecol 30:2359–2397. https://doi.org/10.1007/s10886-004-7941-3

Jaffe K, Sanchez C (1984) On the nestmate-recognition system and territorial marking behaviour in the ant *Camponotus rufipes*. 31:302–315

Jeanne RL (1981) Alarm recruitment, attack behavior, and the role of the alarm pheromone in *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae). Behav Ecol Sociobiol 9:143–148

Jimenez SI, Gries R, Zhai H, et al (2016) Evidence for a Nest Defense Pheromone in Bald-Faced Hornets, *Dolichovespula Maculata*, and Identification of Components. J Chem Ecol 42:414–424. https://doi.org/10.1007/s10886-016-0699-6

Jindra M, Palli SR, Riddiford LM (2013) The juvenile hormone signaling pathway in insect

development. Annu Rev Entomol 58:181–204. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700

Johnson BR (2008) Within-nest temporal polyethism in the honey bee. Behav Ecol Sociobiol 62:777–784. https://doi.org/10.1007/s00265-007-0503-2

Johnson BR, Linksvayer TA (2010) Deconstructing the Superorganism: Social Physiology, Groundplans, and Sociogenomics. Q Rev Biol 3:57–79

K

Kaib M, Eisermann B, Schoeters E, et al (2000) Task-related variation of postpharyngeal and cuticular hydrocarbon compositions in the ant *Myrmicaria eumenoides*. J Comp Physiol - A Sensory, Neural, Behav Physiol 186:939–948. https://doi.org/10.1007/s003590000146

Karlson P, Lüscher M (1959) Pheromones: a New Term for a Class of Biologically Active Substances. Nature 183:55–56

Kather R, Martin SJ (2015) Evolution of Cuticular Hydrocarbons in the Hymenoptera: a Meta-Analysis. J Chem Ecol 41:871–883. https://doi.org/10.1007/s10886-015-0631-5

Keeling MJ, Franklin DN, Datta S, et al (2017) Predicting the spread of the Asian hornet (*Vespa velutina*) following its incursion into Great Britain. Sci Rep 7:6240. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06212-0

Kempraj V, Park SJ, Faveri S De, Taylor PW (2020) Overlooked scents: Chemical profile of soma, volatile emissions and trails of the green tree ant, *Oecophylla smaragdina*. Molecules 25:2112. https://doi.org/10.3390/molecules25092112

Ken T, Hepburn HR, Radloff SE, et al (2005) Heat-balling wasps by honeybees. Naturwissenschaften 92:492–495. https://doi.org/10.1007/s00114-005-0026-5

Kent C, Azanchi R, Smith B, et al (2008) Social Context Influences Chemical Communication in *D. melanogaster* Males. Curr Biol 18:1384–1389. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.088

Kim B, Kim KW, Choe JC (2012) Temporal polyethism in Korean yellowjacket foragers, *Vespula koreensis* (Hymenoptera, Vespidae). Insectes Soc 59:263–268. https://doi.org/10.1007/s00040-011-0212-8

Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: Predicting invaders. Trends Ecol Evol 16:199–204. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02101-2

Kotaki T, Shinada T, Kaihara K, et al (2012) Structure determination of a natural juvenile hormone isolated from a heteropteran insect. Org Lett 11:. https://doi.org/10.1155/2012/924256

Krause J, Ruxton GD (2002) Living in Groups, Oxford Uni

Krokos FD, Konstantopoulou MA, Mazomenos BE (2001) Alkadienes and alkenes, sex pheromone components of the almond seed wasp *Eurytoma amygdali*. J Chem Ecol 27:2169–2181. https://doi.org/10.1023/A:1012218618218

Krupp JJ, Kent C, Billeter JC, et al (2008) Social Experience Modifies Pheromone Expression and Mating Behavior in Male *Drosophila melanogaster*. Curr Biol 18:1373–1383. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.089

Kühbandner S, Bello JE, Mori K, et al (2013) Elucidating structure-bioactivity relationships of methyl-branched alkanes in the contact sex pheromone of the parasitic wasp *Lariophagus distinguendus*. Insects 4:743–760. https://doi.org/10.3390/insects4040743

Kullenberg B, Bergström G, Ställberg-Stenhagen S (1970) Volatile components of the cephalic marking secretion of male bumble bees. Acta Chem Scand 24:1481–1483

L

Laborde-Castérot H, Darrouzet E, Le Roux G, et al (2021) Ocular Lesions Other Than Stings following Yellow-Legged Hornet (*Vespa velutina nigrithorax*) Projections, as Reported to French Poison Control Centers. JAMA Ophthalmol 139:105–108. https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2020.4877

Lacey ES, Ray AM, Hanks LM (2007) Calling behavior of the cerambycid beetle *Neoclytus acuminatus acuminatus* (F.). J Insect Behav 20:117–128. https://doi.org/10.1007/s10905-006-9068-6

Lahav S, Soroker V, Meer RKV, Hefetz A (2001) Segregation of colony odor in the desert ant *Cataglyphis niger*. J Chem Ecol 27:927–943. https://doi.org/10.1023/A:1010382919227

Laurino D, Lioy S, Carisio L, et al (2019) *Vespa velutina* : An alien driver of honey bee colony losses. Diversity 12:5. https://doi.org/10.3390/D12010005

LeBoeuf AC, Waridel P, Brent CS, et al (2016) Oral transfer of chemical cues, growth proteins and hormones in social insects. Elife 5:1–28. https://doi.org/10.7554/eLife.51082

Leffingwell JC, Alford ED (2005) Volatile constituents of perique tobacco. Electron J Environ Agric Food Chem 4:899–915

Lengyel F, Westerlund SA, Kaib M (2007) Juvenile Hormone III Influences Task-Specific Cuticular Hydrocarbon Profile Changes in the Ant *Myrmicaria eumenoides*. J Chem Ecol 33:167–181. https://doi.org/10.1007/s10886-006-9185-x

Lenoir A, Depickère S, Devers S, et al (2009) Hydrocarbons in the Ant *Lasius niger*: From the Cuticle to the Nest and Home Range Marking. J Chem Ecol 35:913–921. https://doi.org/10.1007/s10886-009-9669-6

Lenoir A, Fresneau D, Errard C, Hefetz A (1999) Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. Inf Process Soc Insects 219–237. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8739-7_12

Lenoir A, Malosse C, Yamaoka R (1997) Chemical mimicry between parasitic ants of the genus *Formicoxenus* and their host *Myrmica* (Hymenoptera, Formicidae). Biochem Syst Ecol 25:379–389. https://doi.org/10.1016/S0305-1978(97)00025-2

Lenz EL, Krasnec MO, Breed MD (2013) Identification of Undecane as an Alarm Pheromone of the Ant *Formica argentea*. J Insect Behav 26:101–108. https://doi.org/10.1007/s10905-012-9337-5

Leonhardt SD, Menzel F, Nehring V, Schmitt T (2016) Ecology and Evolution of Communication in Social Insects. Cell 164:1277–1287. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.035

Lepeletier de Saint Fargeau ALM (1836) Histoire naturelle des insectes. Hyménoptères, Librairie. Paris

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

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

Li J, Wang Z, Tan K, et al (2014) Effects of natural and synthetic alarm pheromone and individual pheromone components on foraging behavior of the giant Asian honey bee, *Apis dorsata*. J Exp Biol 217:3512–3518. https://doi.org/10.1242/jeb.110171

Liang D, Silverman J (2000) "You are what you eat": Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. Naturwissenschaften 87:412–416. https://doi.org/10.1007/s001140050752

Lima CG, Sofia Vaz A, Honrado JP, et al (2022) The invasion by the Yellow-legged hornet: A

systematic review. J Nat Conserv 67:. https://doi.org/10.1016/j.jnc.2022.126173
Linn CE, Campbell MG, Roelofs WL (1986) Male moth sensitivity to multicomponent pheromones: Critical role of female-released blend in determining the functional role of components and active space of the pheromone. J Chem Ecol 12:659–668. https://doi.org/10.1007/BF01012100
Lioy S, Bergamino C, Porporato M (2022) The invasive hornet *Vespa velutina* : distribution, impacts and management options. CABI Rev. https://doi.org/10.1079/cabireviews202217030
Lockwood JLJ, Hoopes MMF, Marchetti MMP (2013) Invasion Ecology, 2nd editio. New York
López S, González M, Goldarazena A (2011) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae): First records in Iberian Peninsula. EPPO Bull 41:439–441. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2011.02513.x
Lorenzi MC, D'Ettorre P (2020) Nestmate Recognition in Social Insects: What Does It Mean to Be Chemically Insignificant? Front Ecol Evol 7:. https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00488
Lorenzi MC, Sledge MF, Laiolo P, et al (2004) Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera : Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. J Insect Physiol 50:935–941. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.07.005
Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M (2000) 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Invasive Species Spec. Gr. 12
Lucas C, Brossette L, Lefloch L, et al (2018) When predator odour makes groups stronger: effects on behavioural and chemical adaptations in two termite species. Ecol Entomol 43:513–524. https://doi.org/10.1111/een.12529
Lucas C, Fresneau D, Kolmer K, et al (2002) A multidisciplinary approach to discriminating different taxa in the species complex *Pachycondyla villosa* (Formicidae). Biol J Linn Soc 75:249–259. https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00017.x
Lucas C, Pho DB, Fresneau D, Jallon JM (2004) Hydrocarbon circulation and colonial signature in *Pachycondyla villosa*. J Insect Physiol 50:595–607. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.04.006

M

Majerowicz D, Gondim KC (2013) Insect lipid metabolism: insights into gene expression regulation. In: Recent Trends in Gene Expression. pp 147–149
Mappes J, Marples N, Endler JA (2005) The complex business of survival by aposematism. Trends Ecol Evol 20:598–603. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.011
Márta T, Vas Z (2023) First record of *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 from Hungary (Hymenoptera: Vespidae. Folia Entomol Hungarica rovartani közlemények 84:105–108
Martin S, Drijfhout F (2009) A review of ant cuticular hydrocarbons. J. Chem. Ecol. 35:1151–1161
Martin SJ, Helanterä H, Drijfhout FP (2008a) Colony-specific Hydrocarbons Identify Nest Mates in Two Species of *Formica* Ant. J Chem Ecol 34:1072–1080. https://doi.org/10.1007/s10886-008-9482-7
Martin SJ, Jenner EA, Drijfhout FP (2007) Chemical deterrent enables a socially parasitic ant to invade multiple hosts. Proc R Soc B Biol Sci 274:2717–2722. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0795
Martin SJ, Jones GR (2004) Conservation of Bio synthetic pheromone pathways in honeybees

Apis. Naturwissenschaften 91:232–236. https://doi.org/10.1007/s00114-004-0517-9
Martin SJ, Jones GR, Châline N, Ratnieks FLW (2004) Role of hydrocarbons in egg recognition in the honeybee. Physiol Entomol 29:395–399. https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00404.x
Martin SJ, Takahashi J ichi, Ono M, Drijfhout FP (2008b) Is the social parasite *Vespa dybowskii* using chemical transparency to get her eggs accepted? J Insect Physiol 54:700–707. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.01.010
Martinez Arbizu (2017) PairwiseAdonis: pairwise multilevel comparison using Adonis. R Packag.
Matsuura M, Yamane S (1990) Biology of the vespine wasps. Berlin
Maynard-Smith J, Harper D (2003) Animal signals
Mazzei M, Cilia G, Forzan M, et al (2019) Detection of replicative Kashmir Bee Virus and Black Queen Cell Virus in Asian hornet *Vespa velutina* (Lepelieter 1836) in Italy. Sci Rep 9:. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46565-2
McFrederick QS, Fuentes JD, Roulston T, et al (2009) Effects of air pollution on biogenic volatiles and ecological interactions. Oecologia 160:411–420. https://doi.org/10.1007/s00442-009-1318-9
McGlynn TP (1999) The worldwide transfer of ants: Geographical distribution and ecological invasions. J Biogeogr 26:535–548. https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1999.00310.x
McLafferty F, Turecek F (1993) Interpretation of mass spectra, Fourth edi. Mill Valley, California
Menzel F, Blaimer BB, Schmitt T (2017) How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. Proc R Soc B Biol Sci 284:20161727. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1727
Mertl AL, Traniello JFA (2009) Behavioral evolution in the major worker subcaste of twig-nesting *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae): Does morphological specialization influence task plasticity? Behav Ecol Sociobiol 63:1411–1426. https://doi.org/10.1007/s00265-009-0797-3
Meunier J (2015) Social immunity and the evolution of group living in insects. Philos Trans R Soc B Biol Sci 370:20140102. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0102
Michener CD (1969) Comparative social behavior of bees. Annu Rev Entomol 14:299–342
Miura T, Kamikouchi A, Sawata M, et al (1999) Soldier caste-specific gene expression in the mandibular glands of *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). Proc Natl Acad Sci U S A 96:13874–13879. https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13874
Mizunami M, Yamagata N, Nishino H (2010) Alarm pheromone processing in the ant brain: An evolutionary perspective. Front Behav Neurosci 4:1544. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00028
Modlmeier AP, Foitzik S, Scharf I (2013) Starvation endurance in the ant *Temnothorax nylanderi* depends on group size, body size and access to larvae. Physiol Entomol 38:89–94. https://doi.org/10.1111/phen.12007
Molet M, Péronnet R, Couette S, et al (2017) Effect of temperature and social environment on worker size in the ant *Temnothorax nylanderi*. J Therm Biol 67:22–29. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.04.013
Moller H (1996) Lessons for invasion theory from social insects. Biol Conserv 78:125–142. https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00022-5
Monceau K, Bonnard O, Thiéry D (2013) Relationship between the age of *Vespa velutina* workers and their defensive behaviour established from colonies maintained in the laboratory. Insectes Soc 60:437–444. https://doi.org/10.1007/s00040-013-0308-4
Monceau K, Bonnard O, Thiéry D (2014) *Vespa velutina* : A new invasive predator of honeybees in Europe. J Pest Sci (2004) 87:1–16. https://doi.org/10.1007/s10340-013-

0537-3
Monceau K, Thiéry D (2017) *Vespa velutina* nest distribution at a local scale: An 8-year survey of the invasive honeybee predator. Insect Sci 24:663–674. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12331
Monceau K, Tourat A, Arca M, et al (2017) Daily and Seasonal Extranidal Behaviour Variations in the Invasive Yellow-Legged Hornet, *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae). J Insect Behav 30:220–230. https://doi.org/10.1007/s10905-017-9607-3
Monnin T, Monnin T, Marie P (2006) Chemical recognition of reproductive status in social insects. Ann Zool Fenn Finnish Zool Bot Publ Board 43:515–530
Moore HE, Butcher JB, Adam CD, et al (2016) Age estimation of Calliphora (Diptera: Calliphoridae) larvae using cuticular hydrocarbon analysis and Artificial Neural Networks. Forensic Sci Int 268:81–91. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.09.012

N

Nielsen J, Boomsma JJ, Oldham NJ, et al (1999) Colony-level and season-specific variation in cuticular hydrocarbon profiles of individual workers in the ant *Formica truncorum*. Insectes Soc 46:58–65. https://doi.org/10.1007/s000400050113
Noirot C, Darlington JPE. (2000) Chapter 6 Termite nests: Architecture, regulation and defence. In: Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. pp 121–139
Nowak MA, Tarnita CE, Wilson EO (2010) The evolution of eusociality. Nature 466:1057–1062. https://doi.org/10.1038/nature09205
Nowbahari E, Lenoir A (1989) Age-Related Changes in Aggression in Ant *Cataglyphis Cursor* (Hymenoptera, Formicidae): Influence On Intercolonial Relationships. Behav Processes 18:173–181. https://doi.org/10.1016/s0376-6357(89)80014-2

O

O'Donnell S, Donlan NA, Jones TA (2004) Mushroom body structural change is associated with division of labor in eusocial wasp workers (*Polybia aequatorialis*, Hymenoptera: Vespidae). Neurosci Lett 356:159–162. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.11.053
O'Donnell S, Jeanne RL (1990) Forager specialization and the control of nest repair in *Polybia occidentalis* Olivier (Hymenoptera : Vespidae). Behav Ecol Sociobiol 27:359–364. https://doi.org/10.1007/BF00164007
O'Donnell S, Jeanne RL (1992) Lifelong patterns of forager behaviour in a tropical swarm-founding wasp: effects of specialization and activity level on longevity. Anim Behav 44:1021–1027. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80314-8
Ogle DH, Doll JC, Wheeler P, Dinno A (2022) FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.9.3
Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, et al (2022) Vegan: Community Ecology Package. R Packag. Version 2.6-2
Ono M, Igarashi T, Ohno E, Sasaki M (1995) Unusual thermal defence by a honeybee against mass attack by hornets. Nature 377:334–336
Ono M, Sasaki M (1987) Sex pheromones and their cross-activities in six Japanese sympatri species of the genus *Vespa*. Insectes Soc 34:252–260. https://doi.org/10.1007/BF02224357
Ono M, Terabe H, Hori H, Sasaki M (2003) Components of giant hornet alarm pheromone.

Nature 424:637–638. https://doi.org/10.1038/424637a

Onofre N, Portugal e Castro MI, Nave A, et al (2023) On the Evidence of the European Bee-Eater (*Merops apiaster*) as a Predator of the Yellow-Legged Hornet (*Vespa velutina*) and Its Possible Contribution as a Biocontrol Agent. Animals 13:1906. https://doi.org/10.3390/ani13121906

Oster GF, Wilson EO (1978) Caste and ecology in the social insects, Princeton

Otte T, Hilker M, Geiselhardt S (2015) The Effect of Dietary Fatty Acids on the Cuticular Hydrocarbon Phenotype of an Herbivorous Insect and Consequences for Mate Recognition. J Chem Ecol 41:32–43. https://doi.org/10.1007/s10886-014-0535-9

Otte T, Hilker M, Geiselhardt S (2018) Phenotypic Plasticity of Cuticular Hydrocarbon Profiles in Insects. J Chem Ecol 44:235–247. https://doi.org/10.1007/s10886-018-0934-4

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

P

Panek LM, Gamboa GJ, Espelie KE (2001) The effect of a wasp's age on its cuticular hydrocarbon profile and its tolerance by nestmate and non-nestmate conspecifics (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). Ethology 107:55–63. https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2001.00633.x

Paradis E, Schliep K (2019) Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. Bioinformatics 35:526–528. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633

Paulmier I, Bagnères AG, Afonso CMM, et al (1999) Alkenes as a sexual pheromone in the alfalfa leaf-cutter bee *Megachile rotundata*. J Chem Ecol 25:471–490. https://doi.org/10.1023/A:1020993518226

Perdereau E, Dedeine F, Christidès JP, et al (2011) Competition between invasive and indigenous species: An insular case study of subterranean termites. Biol Invasions 13:1457–1470. https://doi.org/10.1007/s10530-010-9906-5

Perdereau E, Dedeine F, Christidès JP, Bagnères AG (2010) Variations in Worker Cuticular Hydrocarbons and Soldier Isoprenoid Defensive Secretions Within and Among Introduced and Native Populations of the Subterranean Termite, *Reticulitermes flavipes*. J Chem Ecol 36:1189–1198. https://doi.org/10.1007/s10886-010-9860-9

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

Perrard A, 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. Ann la Soc Entomol Fr 45:119–127. https://doi.org/10.1080/00379271.2009.10697595

Pickett JA, Williams IH, Martin AP (1982) Z)-11-eicosen-1-ol, an important new pheromonal component from the sting of the honey bee, *Apis mellifera* L.(Hymenoptera, Apidae.). J Chem Ecol 8:163–175

Pie MR, Rosengaus RB, Traniello JFA (2004) Nest architecture, activity pattern, worker density and the dynamics of disease transmission in social insects. J Theor Biol 226:45–51. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2003.08.002

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

Pliske TE (1975) Courtship Behavior and Use of Chemical Communication by Males of Certain Species of Ithomiine Butterflies (Nymphalidae: Lepidoptera). Ann Entomol Soc Am 68:935–942

Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS (2011) Antifungal free fatty acids: a review. Sci against Microb Pathog Curr Res Technol Adv 3:61–71

Pokorny T, Sieber LM, Hofferberth JE, et al (2020) Age-dependent release of and response to alarm pheromone in a ponerine ant. J Exp Biol 223:. https://doi.org/10.1242/jeb.218040

Popin E, Jacquier JP, Lambert C (2022) Diagnosis of hymenoptera venom allergy. Rev Fr Allergol 62:44–51. https://doi.org/10.1016/j.reval.2021.06.007

Porporato M, Manino A, Laurino D, Demichelis S (2014) *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera Vespidae): A first assessment two years after its arrival in Italy. Redia 97:189–194

Q

Queiroz Fialho MDC, Guss-Matiello CP, Zanuncio JC, et al (2014) A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. J Apic Res 53:392–403. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.3.07

R

Rahman S, Hajong SR, Gévar J, et al (2016) Cuticular Hydrocarbon Compounds in Worker Castes and Their Role in Nestmate Recognition in *Apis cerana indica* . J Chem Ecol 42:444–451. https://doi.org/10.1007/s10886-016-0700-4

Ratnieks FLW (1988) Reproductive harmony via mutual policing by workers in eusocial Hymenoptera. Am Nat 132:217–236

Ratnieks FLW, Foster KR, Wenseleers T (2006) Conflict resolution in insect societies. Annu Rev Entomol 51:581–608. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151003

Ratnieks FLW, Wenseleers T (2005) Policing Insect Societies. Science (80-) 307:54–56

Rebollo S, Díaz-Aranda LM, Martín-Ávila JA, et al (2023) Assessment of the consumption of the exotic Asian Hornet *Vespa velutina* by the European Honey Buzzard *Pernis apivorus* in southwestern Europe. Bird Study 1–15

Reed HC, Landolt PJ (2000) Application of Alarm Pheromone to Targets by Southern Yellowjackets (Hymenoptera : Vespidae). Florida Entomol Soc 83:193–196

Renou M, Anton S (2020) Insect olfactory communication in a complex and changing world. Curr Opin Insect Sci 42:1–7. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.04.004

Requier F, Antúnez K, Morales CL, et al (2018) Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. J Apic Res 57:657–662. https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494919

Requier F, Fournier A, Pointeau S, et al (2023) Economic costs of the invasive Yellow-legged hornet on honey bees. Sci Total Environ 898:. https://doi.org/10.2139/ssrn.4280914

Requier F, Fournier A, Rome Q, Darrouzet E (2020) Science communication is needed to inform risk perception and action of stakeholders. J Environ Manage 257:109983. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109983

Requier F, Rome Q, Chiron G, et al (2019) Predation of the invasive Asian hornet affects foraging activity and survival probability of honey bees in Western Europe. J Pest Sci (2004) 92:567–578. https://doi.org/10.1007/s10340-018-1063-0

Richard FJ, Hunt JH (2013) Intracolony chemical communication in social insects. Insectes Soc

60:275–291. https://doi.org/10.1007/s00040-013-0306-6
Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM (2007) Effects of insemination quantity on honey bee queen physiology. PLoS One 2:e980. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000980
Richter MR (2000) Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. Annu Rev Entomol 45:121–150
Ries C, Schneider N, Vitali F, Weigand A (2021) First records and distribution of the invasive alien hornet *Vespa velutina nigrithorax* du Buysson, 1905 (Hymenoptera: Vespidae) in Luxembourg. Bull la Société des Nat Luxemb 123:181–193
Riley JR, Greggers U, Smith AD, et al (2005) The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. Nature 435:205–207. https://doi.org/10.1038/nature03526
Robinet C, Darrouzet E, Suppo C (2018) Spread modelling: a suitable tool to explore the role of human-mediated dispersal in the range expansion of the yellow-legged hornet in Europe. Int J Pest Manag 65:258–267. https://doi.org/10.1080/09670874.2018.1484529
Robinet C, Suppo C, Darrouzet E (2017) Rapid spread of the invasive yellow-legged hornet in France: the role of human-mediated dispersal and the effects of control measures. J Appl Ecol 54:205–215. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12724
Robinson GE (1992) Regulation of division of labor in insect societies. Encycl Insects 37:637–65. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00086-2
Robinson GE (1985) Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. J Insect Physiol 31:277–282. https://doi.org/10.1016/0022-1910(85)90003-4
Robinson GE (1987) Modulation of alarm pheromone perception in the honey bee: evidence for division of labor based on hormonall regulated response thresholds. J Comp Physiol A 160:613–619. https://doi.org/10.1007/BF00611934
Rodríguez-Flores MS, Falcão SI, Escuredo O, et al (2021a) Chemical profile from the head of *Vespa velutina* and *V. crabro*. Apidologie 52:548–560. https://doi.org/10.1007/s13592-021-00842-0
Rodríguez-Flores MS, Falcão SI, Escuredo O, et al (2021b) Assessment of the in vivo and in vitro release of chemical compounds from *Vespa velutina*. Molecules 26:. https://doi.org/10.3390/molecules26226769
Rodríguez-Flores MS, Seijo-Rodríguez A, Escuredo O, Seijo-Coello M del C (2019) Spreading of *Vespa velutina* in northwestern Spain: influence of elevation and meteorological factors and effect of bait trapping on target and non-target living organisms. J Pest Sci (2004) 92:557–565. https://doi.org/10.1007/s10340-018-1042-5
Roeder KA, Behmer ST (2014) Lifetime consequences of food protein-carbohydrate content for an insect herbivore. Funct Ecol 28:1135–1143. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12262
Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao KA (2017) mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. PLoS Comput Biol 13:1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752
Rojas-Nossa S V., Calviño-Cancela M (2020) The invasive hornet *Vespa velutina* affects pollination of a wild plant through changes in abundance and behaviour of floral visitors. Biol Invasions 22:2609–2618. https://doi.org/10.1007/s10530-020-02275-9
Rojas-Nossa S V., O'Shea-Wheller TA, Poidatz J, et al (2023) Predator and pollinator? An invasive hornet alters the pollination dynamics of a native plant. Basic Appl Ecol 71:119–128. https://doi.org/10.1016/j.baae.2023.07.005
Rome Q, Dambrine L, Onate C, et al (2013) Spread of the invasive hornet *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, in Europe in 2012 (Hym., Vespidae). Bull la Société Entomol Fr 118:21–22. https://doi.org/10.3406/bsef.2013.2580
Rome Q, Muller FJ, Touret-Alby A, et al (2015) Caste differentiation and seasonal changes in

Vespa velutina (Hym.: Vespidae) colonies in its introduced range. J Appl Entomol 139:771–782. https://doi.org/10.1111/jen.12210

Rome Q, Perrard A, Muller F, et al (2021) Not just honeybees: predatory habits of *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae) in France. Ann la Soc Entomol Fr 57:1–11. https://doi.org/10.1080/00379271.2020.1867005

Rome Q, Perrard A, Muller F, Villemant C (2011) Monitoring and control modalities of a honeybee predator, the yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae). Aliens 31:7–15

Rouault J, Capy P, Jallon JM (2001) Variations of male cuticular hydrocarbons with geoclimatic variables: An adaptative mechanism in *Drosophila melanogaster*? Genetica 110:117–130. https://doi.org/10.1023/A:1017987220814

Rubinoff D, Holland BS, Shibata A, et al (2010) Rapid invasion despite lack of genetic variation in the erythrina gall wasp (*Quadrastichus erythrinae* kim). Pacific Sci 64:23–31. https://doi.org/10.2984/64.1.023

Ruhland F, Gabant G, Toussaint T, et al (2023) Reproductives signature revealed by protein profiling and behavioral bioassays in termite. Sci Rep 13:. https://doi.org/10.1038/s41598-023-33252-6

Rundlöf M, Andersson GKS, Bommarco R, et al (2015) Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. Nature 521:77–80. https://doi.org/10.1038/nature14420

S

Sánchez O, Arias A (2021) All that glitters is not gold: The other insects that fall into the asian yellow-legged hornet *Vespa velutina* 'specific' traps. Biology (Basel) 10:448. https://doi.org/10.3390/biology10050448

Sasaki T, Hölldobler B, Millar JG, Pratt SC (2014) A context-dependent alarm signal in the ant *Temnothorax rugatulus*. J Exp Biol 217:3229–3236. https://doi.org/10.1242/jeb.106849

Saslavasky H, Ishay J, Ikan R (1973) Alarm substances as toxicants of the orientalis hornet, *Vespa orientalis*. Life Sci 12:135–144

Schneider SS, DeGrandi-Hoffman G, Smith DR (2004) The African Honey Bee: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. Annu Rev Entomol 49:351–376. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123359

Schorkopf DLP (2016) Male meliponine bees (*Scaptotrigona* aff. *depilis*) produce alarm pheromones to which workers respond with fight and males with flight. J Comp Physiol A 202:667–678. https://doi.org/10.1007/s00359-016-1109-9

Schorkopf DLP, Hrncir M, Mateus S, et al (2009) Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: Further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. J Exp Biol 212:1153–1162. https://doi.org/10.1242/jeb.021113

Schultner E, Oettler J, Helanterä H (2017) The role of brood in eusocial Hymenoptera. Q Rev Biol 92:39–78. https://doi.org/10.1086/690840

Searcy WA, Andersson M (1986) Sexual Selection and the Evolution of Song. Annu Rev Ecol Syst 17:507–533

Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, et al (2017) No saturation in the accumulation of alien species worldwide. Nat Commun 8:. https://doi.org/10.1038/ncomms14435

Segata N, Izard J, Waldron L, et al (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol 12:R60. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60

Shorey HH (1973) Behavioral responses to insect pheromones. Annu Rev Entomol 18:349–380

Silverman J, Liang D (2001) Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. Naturwissenschaften 88:73–77. https://doi.org/10.1007/s001140000198

Slessor KN, Winston ML, Le Conte Y (2005) Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). J Chem Ecol 31:2731–2745. https://doi.org/10.1007/s10886-005-7623-9

Smith AA, Hölldobler B, Liebig J (2009) Cuticular Hydrocarbons Reliably Identify Cheaters and Allow Enforcement of Altruism in a Social Insect. Curr Biol 19:78–81. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.059

Smith CR, Toth AL, Suarez A V., Robinson GE (2008) Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. Nat Rev Genet 9:735–748. https://doi.org/10.1038/nrg2429

Snedden WA, Sakaluk SK (1992) Acoustic signalling and its relation to male mating success in sagebrush crickets. Anim Behav 44:633–639. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80291-X

Soares ERP, Batista NR, Souza R da S, et al (2017) Variation of cuticular chemical compounds in three species of *Mischocyttarus* (Hymenoptera: Vespidae) eusocial wasps. Rev Bras Entomol 61:224–231. https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.05.001

Soroker V, Lucas C, Simon T, et al (2003) Hydrocarbon distribution and colony odour homogenisation in *Pachycondyla apicalis*. Insectes Soc 50:212–217. https://doi.org/10.1007/s00040-003-0669-1

Soroker V, Vienne C, Hefetz A (1995) Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera: Formicidae). J Chem Ecol 21:365–378. https://doi.org/10.1007/BF02036724

Soroker V, Vienne C, Hefetz A, Nowbahari E (1994) The postpharyngeal gland as a "Gestalt" organ for nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*. Naturwissenschaften 81:510–513. https://doi.org/10.1007/BF01132686

Søvik E, Bloch G, Ben-Shahar Y (2015) Function and evolution of microRNAs in eusocial Hymenoptera. Front Genet 6:1–11. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00193

Sprenger PP, Menzel F (2020) Cuticular hydrocarbons in ants (Hymenoptera: Formicidae) and other insects: how and why they differ among individuals, colonies, and species. Myrmecological News 30:31–46. https://doi.org/10.25849/myrmecol.news

Stanley-Samuelson DW, Jurenka RA, Cripps C, et al (1988) Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance. Arch Insect Biochem Physiol 9:1–33. https://doi.org/10.1002/arch.940090102

Stoeffler M, Maier TS, Tolasch T, Steidle JLM (2007) Foreign-language skills in rove-beetles? Evidence for chemical mimicry of ant alarm pheromones in myrmecophilous *Pella* beetles (Coleoptera: Staphylinidae). J Chem Ecol 33:1382–1392. https://doi.org/10.1007/s10886-007-9315-0

Straub L, Williams GR, Pettis J, et al (2015) Superorganism resilience: Eusociality and susceptibility of ecosystem service providing insects to stressors. Curr Opin Insect Sci 12:109–112. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.10.010

Stroeymeyt N, Casillas-Pérez B, Cremer S (2014) Organisational immunity in social insects. Curr Opin Insect Sci 5:1–15. https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.001

Stroeymeyt N, Grasse A V., Crespi A, et al (2018) Social network plasticity decreases disease transmission in a eusocial insect. Science (80-) 362:941–945. https://doi.org/10.1126/science.aat4793

Sturgis SJ, Gordon DM (2012) Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): A review. Myrmecological News 16:101–110

Suarez A V., Holway DA, Case TJ (2001) Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: Insights from Argentine ants. Proc Natl Acad Sci 98:1095–1100. https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1095

Suarez A V., Tsutsui ND, Holway DA, Case TJ (1999) Behavioral and genetic differentiation between native and introduced populations of the Argentine ant. Biol Invasions 1:43–53. https://doi.org/10.1023/A

Sun JS, Xiao S, Carlson JR (2018) The diverse small proteins called odorant-binding proteins. Open Biol 8:180208. https://doi.org/10.1098/rsob.180208

Szathmary E, Smith JM (1995) The major evolutionary transitions. Nature 374:227–232

T

Tan K, Li H, Yang MX, et al (2010) Wasp hawking induces endothermic heat production in guard bees. J Insect Sci 10:142. https://doi.org/10.1673/031.010.14102

Tan K, Wang Z, Chen W, et al (2013) The "I see you" prey-predator signal of *Apis cerana* is innate. Naturwissenschaften 100:245–248. https://doi.org/10.1007/s00114-013-1019-4

Tan K, Wang Z, Li H, et al (2012) An "I see you" prey-predator signal between the Asian honeybee, *Apis cerana*, and the hornet, *Vespa velutina*. Anim Behav 83:879–882. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.12.031

Teseo S, van Zweden JS, Pontieri L, et al (2019) The scent of symbiosis: gut bacteria may affect social interactions in leaf-cutting ants. Anim Behav 150:239–254. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.12.017

Theis N, Lerdau M (2003) The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. Int J Plant Sci 164:S93–S102

Thiele D, Bailey WJ (1980) The function of sound in male spacing behaviour in bush-crickets (Tettigoniidae, Orthoptera). Aust J Ecol 5:275–286. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1980.tb01253.x

Thiéry D, Bonnard O, Riquier L, et al (2018) An alarm pheromone in the venom gland of *Vespa velutina*: evidence revisited from the european invasive population. Entomol Gen 38:145–156. https://doi.org/10.1127/entomologia/2018/0719

Thomas ML, Simmons LW (2008) Sexual dimorphism in cuticular hydrocarbons of the Australian field cricket *Teleogryllus oceanicus* (Orthoptera: Gryllidae). J Insect Physiol 54:1081–1089. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.012

Tibbetts EA (2002) Visual signals of individual identity in the wasp *Polistes fuscatus*. Proc R Soc B Biol Sci 269:1423–1428. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2031

Tillman JA, Seybold SJ, Jurenka RA, Blomquist GJ (1999) Insect pheromones - An overview of biosynthesis and endocrine regulation. Insect Biochem Mol Biol 29:481–514. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00016-8

Trumbo ST, Wilson DS (1992) Brood discrimination, nest mate discrimination, and determinants of social behavior in facultatively quasisocial beetles (*Nicrophorus* spp.). Behav Ecol 4:332–339

Tsutsui ND (2004) The expression component of self / non-self recognition systems. Ann Zool Fenn Finnish Zool Bot Publ Board 41:713–727

Tsutsui ND, Suarez A V., Holway DA, Case TJ (2001) Relationships among native and introduced populations of the Argentine ant (*Linepithema humile*) and the source of introduced populations. Mol Ecol 10:2151–2161. https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01363.x

Turchi L, Derijard B (2018) Options for the biological and physical control of *Vespa velutina nigrithorax* (Hym.: Vespidae) in Europe: A review. J Appl Entomol 142:553–562. https://doi.org/10.1111/jen.12515

Turunen S (1979) Digestion and absorption of lipids in insects. Comp Biochem Physiol -- Part A Physiol 63:455–460. https://doi.org/10.1016/0300-9629(79)90171-3

U

Uboni A, Bagnères AG, Christidès JP, Lorenzi MC (2012) Cleptoparasites, social parasites and a common host: Chemical insignificance for visiting host nests, chemical mimicry for living in. J Insect Physiol 58:1259–1264. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.06.013

V

Vallet A, Cassier P, Lensky Y (1991) Ontogeny of the fine structure of the mandibular glands of the honeybee (*Apis mellifera* L.) workers and the pheromonal activity of 2-heptanone. J Insect Physiol 37:789–804. https://doi.org/10.1016/0022-1910(91)90076-C

Van Der Horst DJ (2003) Insect adipokinetic hormones: Release and integration of flight energy metabolism. Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol 136:217–226. https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00151-9

Van Wilgenburg E, Elgar MA (2007) Colony structure and spatial distribution of food resources in the polydomous meat ant *Iridomyrmex purpureus*. Insectes Soc 54:5–10. https://doi.org/10.1007/s00040-007-0903-3

Van Zweden JS, D'Ettorre P (2010) Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. Chem Commun 222–243. https://doi.org/10.1017/CBO9780511711909

Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML (1998) Pheromone communication in social insects: sources and secretions. Pheromone Commun. Soc. Insects Ants Wasps Bees Termit. 3–33

Vander Meer RK, Saliwanchik D, Lavine B (1989) Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta* - Implications for nestmate recognition. J Chem Ecol 15:2115–2125. https://doi.org/10.1007/BF01207442

Veith HJ, Koeniger N, Maschwitz U (1984) 2-Methyl-3-butene-2-ol, a major component of the alarm pheromone of the hornet *Vespa crabro*. Naturwissenschaften 71:328–329. https://doi.org/10.1007/BF00396622

Veloso Francelino MR, De Lima Mendonça A, Do Nascimento RR, et al (2008) Polyethism and nestmate recognition in the alarm reaction of *Atta* leaf-cutting ants. Physiol Entomol 33:37–42. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2007.00598.x

Verheggen FJ, Haubruge E, De Moraes CM, Mescher MC (2009) Social enviroment influences aphid production of alarm pheromone. Behav Ecol 20:283–288. https://doi.org/10.1093/beheco/arp009

Verheggen FJ, Haubruge E, Mescher MC (2010) Chapter Nine - Alarm Pheromones - Chemical Signaling in response to danger. In: Vitamins & Hormones, Volume 83. pp 215–239

Vernier CL, Chin IM, Adu-Oppong B, et al (2020) The gut microbiome defines social group membership in honey bee colonies. Sci Adv 6:1–10. https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3431

Vernier CL, Krupp JJ, Marcus K, et al (2019) The cuticular hydrocarbon profiles of honey bee workers develop via a socially-modulated innate process. Elife 8:1–27. https://doi.org/10.7554/eLife.41855

Vidal C (2022) The Asian wasp *Vespa velutina nigrithorax*: Entomological and allergological characteristics. Clin Exp Allergy 52:489–498. https://doi.org/10.1111/cea.14063

Vidal C, Armisén M, Monsalve R, et al (2021) Anaphylaxis to *Vespa velutina nigrithorax*: Pattern of sensitization for an emerging problem in western countries. J Investig Allergol Clin Immunol 31:228–235. https://doi.org/10.18176/jiaci.0474

Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, et al (2011a) Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other

continents with niche models. Biol Conserv 144:2142–2150. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.04.009

Villemant C, Muller F, Haubois S, et al (2011b) Bilan des travaux (MNHN et IRBI) sur l'invasion en France de *Vespa velutina*, le frelon asiatique prédateur d'abeilles. Journée Sci Apic 3–12

Villemant C, Zuccon D, Rome Q, et al (2015) Can parasites halt the invader? Mermithid nematodes parasitizing the yellow-legged Asian hornet in France. PeerJ 3:e947. https://doi.org/10.7717/peerj.947

Von Frisch K (1967) The dance language and orientation of bees. Harvard University Press

W

Wadhams LJ (1990) The use of coupled gas chromatography: electrophysiological techniques in the identification of insect pheromones. In: Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones. pp 289–298

Wager BR, Breed MD (2000) Does honey bee sting alarm pheromone give orientation information to defensive bees. Ann Entomol Soc Am 93:1329–1332. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[1329:DHBSAP]2.0.CO;2

Wagner D, Brown MJF, Broun P, et al (1998) Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants *Pogonomyrmex barbatus*. J Chem Ecol 24:2021–2037. https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1020781508889

Wagner D, Tissot M, Gordon DM (2001) Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. J Chem Ecol 27:1805–1819. https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1010408725464

Wang Z, Tan K (2019) Honey Bee Alarm Pheromone Mediates Communication in Plant-Pollinator-Predator Interactions. Insects 10:366. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/insects10100366

Wang Z, Wen P, Qu Y, et al (2016) Bees eavesdrop upon informative and persistent signal compounds in alarm pheromones. Sci Rep 6:. https://doi.org/10.1038/srep25693

Wen P, Cheng Y, Qu Y, et al (2017a) Foragers of sympatric Asian honey bee species intercept competitor signals by avoiding benzyl acetate from *Apis cerana* alarm pheromone. Sci Rep 7:1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03806-6

Wen P, Cheng YN, Dong SH, et al (2017b) The sex pheromone of a globally invasive honey bee predator, the Asian eusocial hornet, *Vespa velutina*. Sci Rep 7:0–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13509-7

Wen P, Ji BZ, Sillam-Dussès D (2014) Trail communication regulated by two trail pheromone components in the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus* (Shiraki). PLoS One 9:. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090906

Weng C, Fu Y, Jiang H, et al (2015) Binding interaction between a queen pheromone component HOB and pheromone binding protein ASP1 of *Apis cerana*. Int J Biol Macromol 72:430–436. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.046

Wertheim B, Van Baalen EJA, Dicke M, Vet LEM (2005) Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: An evolutionary ecological perspective. Annu Rev Entomol 50:321–346. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123329

Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, et al (2008) Assessment of PLSDA cross validation. Metabolomics 4:81–89. https://doi.org/10.1007/s11306-007-0099-6

Wheeler JW, Shamim MT, Brown P, Duffield RM (1983) Semiterpenoid esters from the venom gland of the european hornet, *Vespa crabro*. Tetrahedron Lett 24:5811–5814

Whitehouse MEA, Jaffe K (1995) Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*.

Insectes Soc 42:157–166. https://doi.org/10.1007/BF01242452
Wicker-Thomas C, Chertemps T (2010) Molecular biology and genetics of hydrocarbon production. In: Chemistry, Biochemistry and Physiology. pp 53–74
Wicker-thomas C, Jallon JM (1995) Influence of ovary and ecdysteroids on pheromone biosyntheis in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Eur J Entomol 92:197–202
Wilson EO (1971) The insect societies. Harvard University Press, Cambridge, Massachussetts, USA
Wilson EO (1963) Pheromones. Sci Am 208:100–115
Wilson EO, Hölldobler B (2009) The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies
Wilson EO, Hölldobler B (2005) Eusociality: Origin and consequences. Proc Natl Acad Sci U S A 102:13367–13371. https://doi.org/10.1073/pnas.0505858102
Wilson EO, Regnier FE (1971) The Evolution of the Alarm-Defense System in the Formicine Ants. Am Nat 105:279–289
Winston ML (1987) The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, Massachussetts, USA
Withers GS, Fahrbach SE, Robinson GE (1993) Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. Nature 364:238–240. https://doi.org/10.1038/364238a0
Witt R (2015) Erstfund eines Nestes der Asiatischen Hornisse *Vespa velutina* Lepeletier , 1838 in Deutschland und Details zum Nestbau (Hymenoptera, Vespinae). Ampulex 7:42–53
Wittwer B, Hefetz A, Simon T, et al (2017) Solitary bees reduce investment in communication compared with their social relatives. Proc Natl Acad Sci U S A 114:6569–6574. https://doi.org/10.1073/pnas.1620780114
Woodrow RJ, Grace JK, Nelson LJ, Haverty MI (2000) Modification of Cuticular Hydrocarbons of *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae) in Response to Temperature and Relative Humidity. Environ Entomol 29:1100–1107. https://doi.org/10.1603/0046-225X-29.6.1100
Wyatt TD (2003a) Pheromones and Animal Behaviour, The press. Oxford
Wyatt TD (2003b) Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste, Cambridge
Wyatt TD (2014) Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures. Cambridge University Press

Y

Yang S, Gayral P, Zhao H, et al (2019) Occurrence and molecular phylogeny of honey bee viruses in vespids. Viruses 12:1–13. https://doi.org/10.3390/v12010010
Yew JY, Chung H (2015) Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. Prog. Lipid Res. 59:88–105

Site internet

(2022) Pherobase.com. In: Pherobase database pheromones Semiochem.

Annexe

Chemoecology (2021) 31:227–238
https://doi.org/10.1007/s00049-021-00343-7

CHEMOECOLOGY

ORIGINAL ARTICLE

Nest structures display specific hydrocarbon profiles: insights into the chemical ecology of the invasive yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax*

Mélissa Haouzi[1] · Jérémy Gévar[2] · Alix Khalil[1] · E. Darrouzet[1]

Received: 27 March 2020 / Accepted: 2 March 2021 / Published online: 9 March 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

Abstract

In insects, chemical communication is the most common form of communication, and cuticular hydrocarbons (CHCs) are employed in recognition processes. In social insects, CHCs also help define colony identity and thus contribute to social cohesion among nestmates. Individuals can deposit their chemical signatures on nest surfaces. This information serves as a reference for newly emerged individuals and allows them to obtain the odor specific to their colony. This study examined nest chemical profiles in an inbred invasive species: the yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax.* We demonstrated that nest structures (i.e., envelopes, combs, and pillars) had specific hydrocarbon profiles, which were colony specific. There were similarities between the chemical profiles of the nests and the CHC signatures of hornets. The loss of genetic diversity previously documented in the yellow-legged hornet population in France does not appear to have constrained nest chemical diversity.

Keywords Cuticular hydrocarbons · Chemical marking · Hymenoptera · Invasive species

Introduction

The members of social insect colonies operate as a unit and are thus considered to form a higher-level organism (Wheeler 1911). The stability of social groups relies on group members being able to differentiate between those who belong to the group and those who do not (Hamilton 1987). This recognition system is based on chemical cues (Hölldobler 1995).

In insects, chemical communication can be carried out by pheromones, and substrates may be marked with volatile or non-volatile compounds. In social insects, nestmates can communicate using cuticular hydrocarbons (CHCs). CHCs are non-volatile compounds and form a complex layer on the insect cuticle, providing essential protection against desiccation (Hadley 1984; Gibbs 1998). They also play a key role in kin recognition (Espelie and Hermann 1990), nestmate recognition (Hefetz 2007; D'Ettorre and Lenoir 2010), caste recognition (Howard et al. 1982; Smith and Taylor 1990; Bagnères et al. 1998; Kaib et al. 2000), and the division of labor (Bonavita-Cougourdan et al. 1993; Scholl and Naug 2011; Rahman et al. 2016). The CHC signatures of insects are often complex and dynamic, with compound levels that vary qualitatively and quantitatively (Bonavita-Cougourdan et al. 1993; Lenoir et al. 1999, 2001). Indeed, insects have personalized chemical signatures that are shaped by endogenous factors (Fan et al. 2004; Lengyel et al. 2007; Darrouzet et al. 2014), exogenous factors (Bagnères et al. 1990), and parasitism (Bagnères et al. 1996; Darrouzet et al. 2010; Lebreton et al. 2010). An individual's chemical signature serves as a type of highly specific "visa," conveying the individual's identity to conspecifics (Fresneau and Errard 1994).

Some invasive social insects are tolerant of small differ- ences in CHC signatures, a trait that enhances their invasive success (Suarez et al. 1999; Tsutsui et al. 2001; Pedersen et al. 2006; Brandt et al. 2009). In such species, colonies dif- fer less in their chemical profiles and thus compete less for resources. One example of this phenomenon is the Argentine

Communicated by Marko Rohlfs.

E. Darrouzet
eric.darrouzet@univ-tours.fr

[1] IRBI, UMR CNRS 7261, University François Rabelais of Tours, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

[2] iEES Paris, INRA, 78026 Versailles, France

ant, *Linepithema humile*, which has successfully colonized several continents (Holway and Case 1999; Suarez et al. 2000). In this context, attention has turned to a species that recently invaded Europe: the yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax*. This hornet is native to China and, more specifically, comes from two provinces near Shanghai (Arca 2012; Arca et al. 2015). It was accidentally introduced into southwestern France around 2004 (Haxaire et al.2006) and then spread rapidly throughout Europe (Robinet et al. 2018). It is now found in Spain, Portugal, Italy, Germany, and, more recently, in Belgium, the Netherlands, Switzer- land, and the United Kingdom (Bruneau 2011; López et al. 2011; Grosso-silva and Maia 2012; Demichelis et al. 2014; Monceau and Thiéry 2017; Robinet et al. 2017, 2018). To feed its larvae, it consumes large quantities of insects (Vil- lemant et al. 2011) and, more particularly, of honey bees (Darrouzet and Gévar 2014; Darrouzet 2019). Bee colonies suffer as a result, and their foraging activity decreases, thus impacting beekeeping (Requier et al. 2018, 2019; Leza et al. 2019). Not only is the yellow-legged hornet a threat to biodi- versity, but it is also responsible for drastic economic losses as well as public health concerns (Beggs et al. 2011; Dar- rouzet 2019; Laborde-Castérot et al. 2020).

Despite the lack of genetic diversity in the European yellow-legged hornet population (Arca et al. 2015; Dar- rouzet et al. 2015), hornet chemical signatures, composed of CHCs, were found to vary tremendously based on caste, sex, and colony (Gévar et al. 2017). This result was sur- prising because such heterogeneity has not been observed in other invasive social insects, such as ants [*Linepithema humile* (Tsutsui et al. 2000; Brandt et al. 2009); *Wasmannia auropunctata* (Errard et al. 2005)] or termites [*Reticulitermes flavipes* (Perdereau et al. 2010)]. Previous studies have suggested that this lower level of chemical variability may arise from the reduced genetic diversity that can result from genetic bottlenecks (Tsutsui et al. 2001) or selection against less-common recognition alleles (Giraud et al. 2002). Gévar et al. (2017) suggested that the heterogeneity of CHC profiles in *Vespa velutina nigrithorax* may be affected by environmental and/or epigenetic factors. For example, in termites, changes in temperature or diet can erase or modify colony odor in *Coptotermes formosanus* (Shelton and Grace 1997; Florane et al. 2004). In *Reticulitermes flavipes*, sea-sonal variation can modify chemical signatures (Bagnères et al. 1990); in *Cryptotermes brevis*, profiles shift depending on specific combinations of temperature and relative humid- ity (Woodrow et al. 2000). The composition of the intestinal bacteria community can also affect nestmate recognition in *Reticulitermes speratus* (Matsuura 2001, 2003).

In eusocial insects, nest odors are present and attractive to colony members (Kukuk et al. 1977; Gamboa et al. 1986; Ferguson et al. 1987). Indeed, colony odor helps maintain colony unity in ants and termites (Wilson 1971). Insects may use visual cues for nest recognition, but olfactory cues have also been observed in *Apis mellifera* (Butler et al. 1969, 1970; Free 1987) and *Lasioglossum zephyrum* (Kukuk et al. 1977). Cuticular hydrocarbons may be deposited on nest structures, like the walls and soil surfaces of ant nests (Bos et al. 2011), the waxy combs of beehives (Couvillon et al. 2007), and the paper nests of social wasps (Espelie and Hermann 1990; Elia et al. 2017). For example, the ant *Lasius niger* passively deposits CHCs on the inner walls of its nest via its tarsi (Devigne and Detrain 2006; Lenoir et al. 2009). *Camponotus aethiops* indirectly transfers CHCs to its nest, creating a uniform colony odor (Bos et al. 2011). In the social wasp *Polistes metricus*, the CHCs of adult wasps may be similar to those of the nest (Espelie et al. 1990). The chemical compounds laid down within the nest allow newly emerged individuals to recognize and obtain their colony's signature (Singer and Espelie 1992). In the social wasp *Polistes biglumis*, there is temporal variation in nest chemical profiles, which can also shift when colonies are invaded by the social parasite *Polistes atrimandibularis* (Elia et al. 2017).

This study aimed to investigate (1) whether nests built by *Vespa velutina nigrithorax* displayed hydrocarbon-based chemical profiles, (2) whether the three main nest struc-tures (envelopes, combs, and pillars) had similar or dif-ferent chemical profiles, and (3) whether nests differed in their chemical profiles. We hypothesized that, since hornet workers display colony-specific CHC signatures (Gévar et al. 2017), the latter should be reflected in the chemical profiles of nests, since hydrocarbons should be deposited onto nest materials. This process could influence colony signatures across generations (Singer and Espelie 1992), overcom- ing the effects of inbreeding within the invasive population (Darrouzet et al. 2015).

Materials and methods

Vespidae nests are built with plant fibers mixed with water and saliva (Edwards 1980). Yellow-legged hornet nests are located in different habitats but frequently occur in tree tops; they can generally be distinguished from the nests of other social Vespidae in France by the presence of a lat- eral entrance (Rome et al. 2009; Darrouzet 2013, 2019). Nests are composed of a stack of several combs that are connected by pillars and covered by a protective envelope (Darrouzet 2019). The combs are composed of alveolar cells that open downward; these cells harbor larvae and nymphs at different developmental stages. The top of the nest does not contain cells; instead, it consists of a sponge-like struc- ture that likely protects the lower part of the nest (where the hornets are found) against harsh environmental conditions (e.g., rain). Nest construction follows a cyclical pattern and

varies depending on the colony's degree of development. After overwintering, the foundress will begin nest building in early spring (March–April): she will first affix the pedicel and then build an initial comb of a dozen alveolar cells that are surrounded by a protective envelope. Around May, work- ers will emerge. They will enlarge and strengthen the nest along the vertical axis by adding new combs and along the horizontal axis by adding new cells to already established combs (Rome et al. 2015; Darrouzet 2019).

Chemical analysis of different nest structures

Nest collection

A total of ten *Vespa velutina nigrithorax* nests (Table S1) were collected in France's Centre-Val-de-Loire region between 2015 and 2017. Each nest was processed imme- diately and stored at − 20 °C. Chemical extractions were carried out in 2018.

Hydrocarbon extractions

Hydrocarbons were extracted from three distinct nest structures: the envelopes, the combs, and the pillars. For each structure, three replicates were performed per nest (n = 10 nests). To extract the hydrocarbons, 150 mg of structural material was placed in a 20-ml glass vial and crushed down to small particles. Then, 5 ml of heptane was added, and the whole mixture was vortexed for 1 min at 300 rpm. It was left to rest for 24 h, allowing the particles to settle. Subsequently, 1.5 ml of the supernatant was transferred into 2-ml glass vials and fully evaporated under nitrogen flux. Then, 150 µl of heptane was added to each vial, and the mixture was vortexed for 30 s at 300 rpm. Afterward, 100-µl ali- quots of these extracts were transferred into vials. Before the chemical analyses were performed, 3 µl of C20 (n-eicosane 10^{-3} g/ml) was added as an internal standard.

Detailed comb analyses

Nest collection and sampling

To carry out a more detailed chemical analysis of the nests, three end-of-season nests (i.e., large nests; Table S2) were collected in the Centre-Val-de-Loire, Brittany, and Pays-de- la-Loire regions from February to March 2018. The combs' hydrocarbon profiles were analyzed by taking samples from different parts of the nest: from the top comb to the bottom comb and from the center, middle, and periphery of the individual combs. In each case, three replicates were performed (n = 3 nests).

Hydrocarbon extraction

To extract the hydrocarbons, 150 mg of structural material was collected. Then, 5 ml of heptane was added. The whole mixture was vortexed for 1 min at 300 rpm and left to rest for 24 h. Subsequently, 100 µl of the supernatant was transferred to 2-ml glass vials containing an insert. Before the chemical analyses were performed, 3 µl of the internal standard (C20 n-eicosane at 10^{-3} g/ml) was added to samples.

Chemical analyses

Samples were analyzed using gas chromatography (GC), employing an Agilent Technologies 7000C GC/MS Tri- ple Quad with a 7890 BGC System equipped with a capil- lary column (HP-5 Agilent Technology, Santa Clara, USA; 30 m × 0.32 mm × 0.25 µm); helium was the carrier gas (1.7 ml/min). The following temperature program was used: an initial temperature ramp from 50 to 200 °C at 8 °C/min, a second temperature ramp from 200 to 315 °C at 5 °C/min, and a 5-min final hold at 315 °C. The surface areas of the 27 major peaks were determined using ChemStation soft- ware (Agilent Technologies). The hydrocarbon profiles of the nests were compared to the species' chemical signature. The identities of the chemical compounds present on the nest structures were determined via comparison with the *Vespa velutina nigrithorax* CHCs analyzed using the same GC system (Gévar et al. 2017). Compound identities were confirmed using GC–MS analyses performed with an Agi- lent Technologies 7000C GC/MS Triple Quad with a 7890B GC System equipped with the same column as above; we also used the same temperature program as above.

Calculations and statistical analyses

Principal component analysis (PCA) was carried out using R software (v. 3.4.3) and the packages FactoMineR (Lê et al. 2008) and RcmdrPluginFactoMineR (Fox 2005), which are included in the software. Differences in the hydrocarbon profiles of the three nest structures (envelopes, combs, and pillars) among and within nests were quantified using the Nei distance (Nowbahari et al. 1990; Dronnet et al. 2006). A dissimilarity matrix, which included all possible pair- wise comparisons (within structures, among structures within nests, and among nests for a given structure), was constructed using the mean relative areas of the hydrocarbon peaks. The matrix was then analyzed using a Kruskal–Wal- lis test implemented in RStudio (v. 1.0.143; ©2009–2016 RStudio, Inc). For each structure, hydrocarbon quantity was estimated using the following formula: Qi = (QC20 × xi)/(xC20i) (Gévar et al. 2017). The quantity of each hydrocarbon was then divided by the mass of the nest sample to obtain the mass-specific quantity of each compound. Then,

Kruskal–Wallis nonparametric tests were performed using RStudio software.

Results

Hydrocarbon analyses

The nest structures bore the same hydrocarbon compounds as the cuticle of *Vespa velutina nigrithorax* (Gévar et al. 2017) (Table 1). There were 8 alkanes, 10 methyl alkanes, 3 dimethyl alkanes, 1 di/trimethyl alkane, and 5 alkenes among the 27 major peaks analyzed.

Differences in nest structure hydrocarbons

The three nest structures (envelopes, combs, and pillars) had distinct hydrocarbon profiles (Fig. 1) in which certain compounds predominated. In particular, there were two alkanes and three methyl alkanes specifically found in the envelopes and combs; one alkane and one methyl alkane specifically found in the combs and pillars; and one alkane, five methyl alkanes, two dimethyl alkanes, and two alkenes specifically found in the envelopes and pillars (Table 2).

Chemical distances for nest structures

Chemical distances were compared within and among nest structures (Fig. S1). Chemical distances within structures (i.e., among samples from a given structure, regardless of nest identity) were significantly smaller than chemical dis- tances among structures (i.e., among nest structures within the same nest, regardless of nest identity) (Kruskal–Wal- lis; p value < 0.001). Similarly, for each structure, chemi- cal distances among nests were significantly greater than chemical distances within structures (Kruskal–Wallis; p value < 0.001).

Quantitative analyses of the nest structures

The envelopes had significantly lower quantities of total hydrocarbons than did the other two structures

Table 1 Identities and relative proportions of the hydrocarbons found on the three nest structures: envelopes, combs, and pillars

RT (min)	Compound identity	ECL	Envelopes		Combs		Pillars	
			%	±SD	%	±SD	%	±SD
23.8	n-C20	20	X	X	X	X	X	X
28.8	n-C23	23	3.57	0.56	1.92	0.11	2.62	0.13
31.5	C25:1	24.72	0.68	0.11	0.76	0.10	0.66	0.04
31.9	n-C25	25	16.49	0.53	15.72	0.84	17.23	0.32
32.4	13-+11-MeC25	25.37	1.86	0.19	1.51	0.09	2.14	0.13
32.7	5-MeC25	25.47	0.36	0.11	0.33	0.03	0.35	0.04
33.1	3-MeC25	25.70	3.88	0.22	3.10	0.16	3.28	0.19
33.5	n-C26	26	1.72	0.05	1.59	0.13	1.60	0.09
34.1	12-+10-MeC26	26.31	0.55	0.14	0.45	0.04	0.50	0.03
34.7	C27:1	26.75	4.30	0.35	5.25	0.46	4.94	0.22
34.8	C27:1	26.83	1.14	0.14	1.07	0.10	0.92	0.06
35.1	n-C27	27	23.71	1.28	32.01	2.58	29.63	0.96
35.5	13-+11-+9MeC27	27.32	4.66	0.56	4.91	0.87	5.82	0.71
35.6	7,MeC27	27.37	0.90	0.23	0.80	0.06	0.87	0.08
35.9	11,15-diMeC27	27.64	4.04	0.52	2.77	0.27	2.65	0.16
36.1	3-MeC27	27.81	8.41	0.31	6.38	0.74	7.48	0.22
36.2	5,15-diMeC27	27.89	1.13	0.49	1.68	0.64	0.95	0.11
36.4	n-C28	28	3.00	150	0.79	0.07	0.87	0.08
36.7	diMe or triMeC27	28.13	1.05	0.23	1.02	0.16	0.97	0.12
36.9	12-MeC28	28.35	2.33	0.47	0.62	0.18	0.48	0.04
37.6	C29:1	28.78	2.32	0.15	3.24	0.36	3.59	0.14
37.7	C29:1	28.84	1.13	0.17	2.08	0.41	1.29	0.08
37.9	n-C29	29	5.39	0.39	5.80	0.66	5.43	0.25
38.4	13-+11-+9-MeC29	29.37	1.81	0.18	2.21	0.23	2.61	0.07
38.8	11,15-+11,17-diMeC29	29.68	1.80	0.26	1.37	0.32	1.06	0.15
39.7	4-MeC30	30.44	0.64	0.22	0.20	0.05	0.32	0.14
40.7	n-C31	31	3.32	1.05	2.39	0.37	1.69	0.13

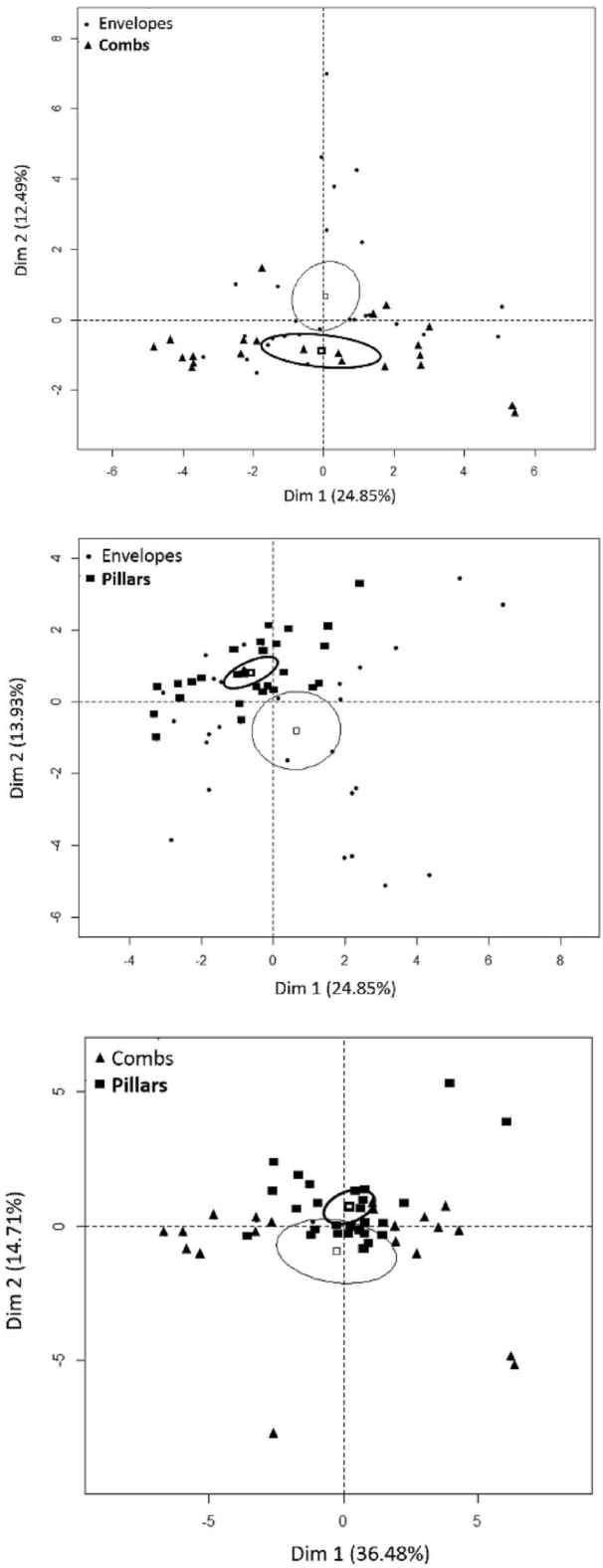


Fig. 1 Results of the principal component analysis of the proportion of hydrocarbons found on the three nest structures; the first two axes are shown. Three comparisons were performed: envelopes vs. combs, envelopes vs. pillars, and combs vs. pillars

(Kruskal–Wallis; p value < 0.001). The combs had significantly higher quantities of total hydrocarbons than did the pillars (Kruskal–Wallis; p value < 0.05) (Fig. 2).

The structures all differed from each other in specific hydrocarbon quantities (Kruskal–Wallis; p value < 0.001 for most comparisons, with p value < 0.05 for the compari- sons of alkanes and branched alkanes between the pillars and combs). For each compound, the envelopes displayed the lowest quantities, and the combs displayed the highest quantities (Fig. 3).

Qualitative analyses of the combs

Within combs, we found no significant differences among center samples or between center and middle samples (regardless of comb or nest) (Kruskal–Wallis; p value>0.05; Fig. S2). The chemical distances between center and periph- ery samples were significantly higher than the chemi- cal distances among center samples (Kruskal–Wallis; p value < 0.001; Fig. S2). Finally, the chemical distances among middle samples and among periphery samples were significantly different as were the chemical distances between middle and periphery samples (Kruskal–Wallis; p value<0.001; Fig. S2).

The results for the chemical distances among combs (Fig. S3) revealed that only comb 1 (the oldest comb, found at the top of the nest) was significantly different from all the others (Kruskal–Wallis; p value<0.05), with the exception of comb 7 (Kruskal–Wallis; p value > 0.05). The other combs were not significantly different from each other (Kruskal–Wallis; p value>0.05).

Quantitative analyses of the combs

Within combs, hydrocarbon quantities decreased signifi- cantly from the center to the periphery (Kruskal–Wallis; p value<0.001 for the center/periphery and middle/periphery comparisons and p value < 0.05 for center/middle compari- son) (Fig. 4).

Across combs, hydrocarbon quantities differed signifi- cantly between combs 1, 2, 3, and 4 and combs 6 and 7 (Kruskal–Wallis; p value < 0.05); comb 5 was only sig- nificantly different from comb 7 (Kruskal–Wallis; p value < 0.05) (Fig. 5).

Discussion

Many studies have shown that nest recognition in social insects is based on chemical cues. Such is the case in bum- ble bees (Saleh et al. 2007), in honey bees and wasps (But- ler et al. 1969), and in ants (Depickère et al. 2004). In this study, hydrocarbons previously found on the hornet's cuticle

Table 2 Differences in hydrocarbon quantities among nest structures (Kruskal–Wallis chi-squared test)

Compound	Structure comparison		
	Envelopes/combs	Envelopes/pillars	Combs/pillars
n-C23	NS	NS	$p < 0.01$
25:1	NS	NS	NS
n-C25	NS	NS	NS
13-+11-MeC25	NS	$p = 0.01$	$p < 0.01$
5-MeC25	NS	NS	NS
3-MeC25	$p = 0.01$	$p < 0.01$	NS
n-C26	NS	NS	NS
12-+10-MeC26	NS	NS	NS
C27:1	NS	$p = 0.01$	NS
C27:1	NS	NS	NS
n-C27	$p < 0.05$	$p < 0.01$	NS
13-+11-+9MeC27	NS	NS	NS
7,MeC27	NS	NS	NS
11,15-diMeC27	NS	$p < 0.05$	NS
3-MeC27	$p < 0.05$	$p = 0.01$	NS
5,15-diMeC27	NS	NS	NS
n-C28	$p < 0.01$	NS	NS
diMe or triMeC27	NS	NS	NS
12-MeC28	$p < 0.05$	$p < 0.01$	NS
C29:1	NS	$p < 0.01$	NS
C29:1	NS	NS	NS
n-C29	NS	NS	NS
13-+11-+9-MeC29	NS	$p < 0.01$	NS
11,15-+11,17-diMeC29	NS	$p = 0.05$	NS
4-MeC30	NS	NS	NS
n-C31	NS	NS	NS

Levels of five compounds differed between the envelopes and combs; levels of ten compounds differed between the envelopes and pillars; and levels of two compounds differed between the combs and pillars

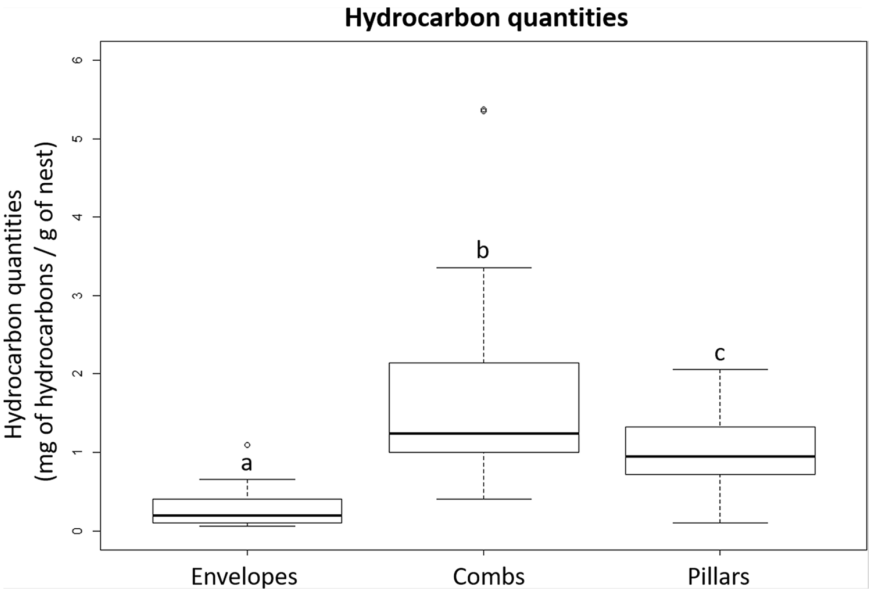


Fig. 2 Total hydrocarbon quantities found on the envelopes, combs, and pillars (mg of hydrocarbons/gram of nest material)

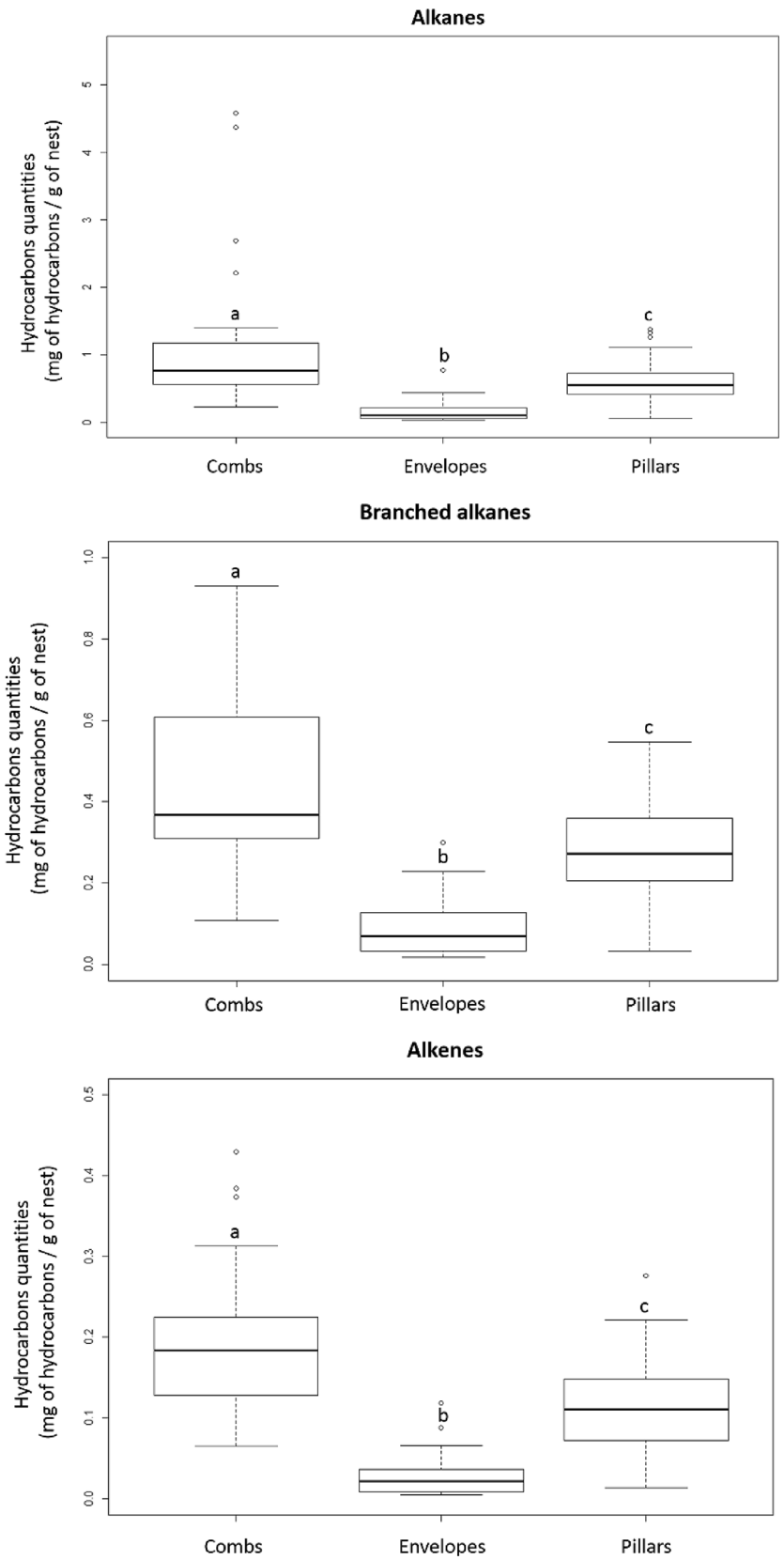


Fig. 3 Quantities of alkanes, branched alkanes, and alkenes found on the envelopes, combs, and pillars (mg of hydrocarbons/gram of nest material)

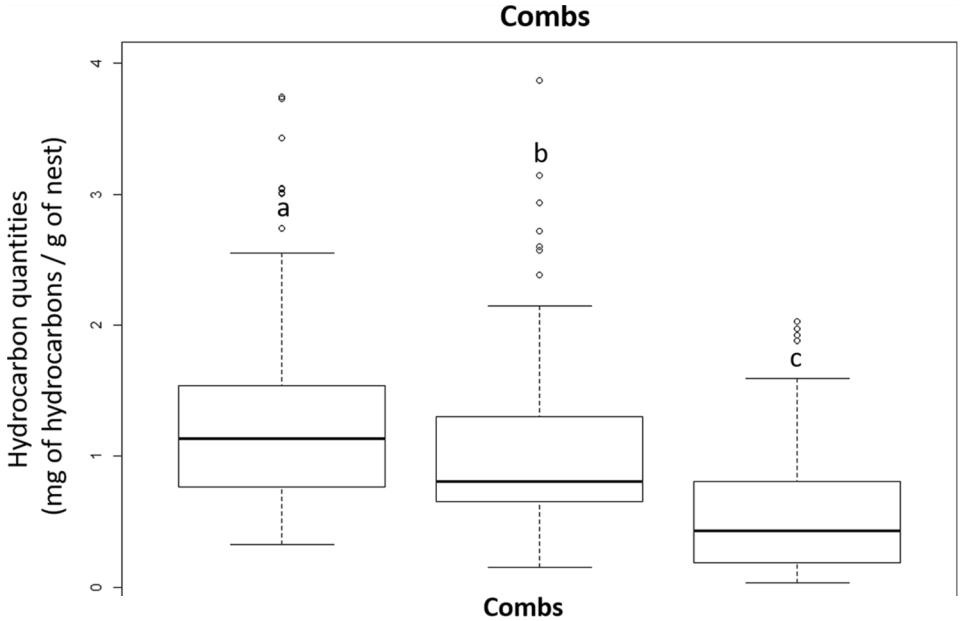


Fig. 4 Total hydrocarbon quantities (mg of hydrocarbons/gram of nest material) at the comb's center, middle, and periphery

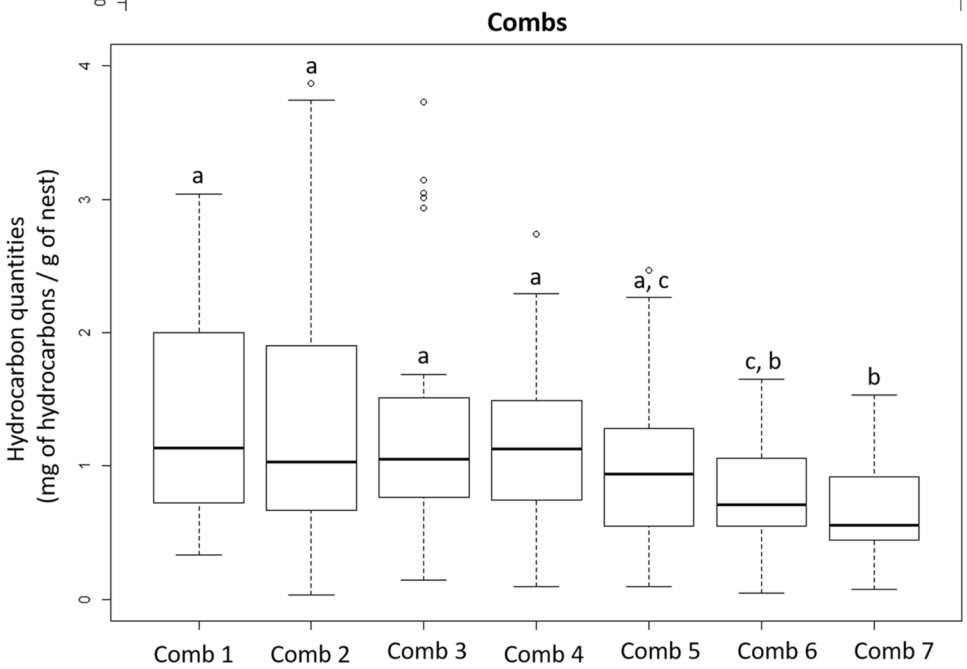


Fig. 5 Total hydrocarbon quantities (mg of hydrocarbons/ gram of nest material) from the top comb to the bottom comb within nests

(Gévar et al. 2017) were discovered to occur on different parts of the hornet's nest. This finding suggests *Vespa velutina nigrithorax* deposits CHCs on nest structures. However, we do not know if deposition is active or passive. Indeed, no data on *Vespa velutina* behavior within the nest are currently available. Consequently, we do not know if the hornet interacts in a particular way with the nest substrate. Some species are known to directly interact with nest materials and/or with nestmates to obtain/deposit chemical markings (Akino 2008). For example, some European *Polistes* species apply chemical markings via rubbing (Turillazzi and Ugo- lini 1979). Conversely, in *Lasius niger*, ants passively mark the nest with their tarsi as they walk across the substrate (Depickère et al. 2004; Devigne and Detrain 2006; Lenoir et al. 2009). Further behavioral studies are thus needed to clarify marking mechanisms in *V. velutina*.

Chemical signatures are colony and caste specific in *V. velutina* (Gévar et al. 2017). In our study, we observed

pronounced qualitative and quantitative chemical differences among nest structures. This finding may indicate that individuals differing in caste or reproductive status (fertile vs. non-fertile females) occur in separate parts of the nest. For example, chemical signatures can vary among castes: *V. velutina* queens bear four specific alkenes and have higher levels of CHCs than do other castes (Gévar et al. 2017). However, the queen-specific compounds were not found on the nest structures. The chemical signatures of nest structures are likely shaped by the chemical deposits of colony members, whose CHC signatures vary in their absolute and relative composition. This variation is functional and is likely influenced by a variety of recognition-oriented behaviors and discrimination among individuals (Hölldobler and Carlin 1987). For example, monomethyl alkanes often serve as signals (Nelson 1993). Hydrocarbons could, therefore, function in recognition and communication within nests. Indeed, the nest's interior is opaque, creating dark conditions. Individuals thus need a mechanism other than vision to locate each other within the nest. Labeling nest structures so that they have different chemical profiles could allow insects to orient themselves and communicate with each other. The fact that combs and envelopes had the highest and lowest quantities of hydrocarbons, respectively, might sup- port this hypothesis. However, these differences could also arise from the higher contact frequencies among individuals and between individuals and comb surfaces inside the nest. Furthermore, there could be smaller quantities of hydrocarbons on the envelopes because they are exposed to exte- rior conditions (e.g., rainfall could wash them away). More experiments are necessary to explore these issues. Moreover, nest structures were also qualitatively different from each other. This finding is interesting because branched alkanes and alkenes help define the chemical identity of colonies and are involved in communication among individuals (Howard and Blomquist 2005). Linear alkanes may play more of a role in physically protecting individuals against desiccation (Hadley 1984; Singer 1998). Consequently, their high levels on the nest's surface could provide protection against wet and humid conditions. Indeed, because the hornet's nest is composed of "paper mache", it is likely that chemical protection would be required. When n-alkanes and monomethyl alkanes are combined, they produce an impermeable layer whose solid–liquid phase transition extends over a wide temperature range (Gibbs 1995), allowing the nest to benefit from seasonal waterproofing. Finally, the chemical heterogeneity of nest structures could be explained by temporal shifts. In *Bombus terrestris*, cuticular lipids convey colony identity and change over time (Rottler-Hoermann et al. 2016). Further research is needed to clarify the chemical dynamics of nests.

We also found that there was spatial heterogeneity in the combs' chemical profiles. Hydrocarbon quantity decreased from the center to the periphery of the combs and from the top combs to the bottom combs. It appeared that the oldest parts of the nest (i.e., the center of the comb and the top comb) had greater quantities of hydrocarbons. This observation could be explained by structure age, these structures had spent more time in contact with adult hornets. There were qualitative differences along the horizontal axis of the individual combs, signaling differences associated with time of construction. In contrast, there were no differences along the vertical axis of the combs. These results suggest that marking patterns within nests may be somewhat complex. Further research is needed to clarify hydrocarbon deposition mechanisms and dynamics within nests and across time.

Finally, the chemical diversity among nests and among structures highlights the existence of a colony signature. Indeed, chemical diversity among nests was high. As described by Gévar et al. (2017), individual *V. velutina* hornets vary in their chemical signatures, and we observed the same variability in the species' nests. Consequently, the chemical heterogeneity observed among individuals could explain the heterogeneity seen in the nests themselves. This result was somewhat surprising, however, because hornet populations in France are highly related (Darrouzet et al. 2015) as the result of a genetic bottleneck (Arca et al. 2015). Previous studies of invasive species all found that chemical variability was reduced in introduced populations. Indeed, this is the case in the ants *Linepithema humile* (Brandt et al. 2009) and *Wasmannia auropunctata* (Errard et al. 2005) as well as in the termite *Reticulitermes flavipes* (Perdereau et al. 2010). This phenomenon could be related to the limited number of introductions that have taken place. In the case of *V. velutina* in France, the population is inbred; the heterogeneity in hydrocarbon profiles within nests could result from environmental and/or epigenetic factors (Gévar et al. 2017). Additional research is clearly necessary to assess the roles played by different factors in shaping nest chemical profiles.

Supplementary Information The online version contains supplemen- tary material available at https://doi.org/10.1007/s00049-021-00343-7.

Acknowledgements We gratefully acknowledge C. Poirier, R. Cuar- téro, and L. Marteil for their help in collecting colonies in the field, L. Berville for her comments on the manuscript, and J. Pearce for her English-language editing services. This study was supported by fund- ing from the Centre-Val-de-Loire regional government (FRELON2 project).

References

Akino T (2008) Chemical strategies to deal with ants: a review of mimicry, camouflage, propaganda, and phytomimesis by ants (Hymenoptera: Formicidae) and other arthropods. Myrmecol News 11:173–181

Arca M (2012) Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae). Université Pierre et Marie Curie
Arca M, Mougel F, Guillemaud T et al (2015) Reconstructing the inva- sion and the demographic history of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, in Europe. Biol Invasions 17:2357–2371. https://doi.org/10.1007/s10530-015-0880-9
Bagnères AG, Clément JL, Blum MS et al (1990) Cuticular hydrocar- bons and defensive compounds of *Reticulitermes flavipes* (Kol- lar) and *R. santonensis* (Feytaud): polymorphism and chemot- axonomy. J Chem Ecol 16:3213–3244. https://doi.org/10.1007/ BF00982094
Bagnères AG, Lorenzi MC, Dusticier G et al (1996) Chemical usur- pation of a nest by paper wasp parasites. Am Assoc Adv Sci 272:889–892
Bagnères AG, Rivière G, Clément JL (1998) Artificial neural net- work modeling of caste odor discrimination based on cuticular hydrocarbons in termites. Chemoecology 8:201–209. https://doi.org/10.1007/s000490050026
Beggs JR, Brockerhoff EG, Corley JC et al (2011) Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. Biocontrol 56:505– 526. https://doi.org/10.1007/s10526-011-9389-z
Bonavita-Cougourdan A, Clement JL, Lange C (1993) Functional subcaste discrimination (foragers and brood-tenders) in the ant *Camponotus vagus* Scop.: polymorphism of cuticular hydrocar- bon patterns. J Chem Ecol 19:1461–1477. https://doi.org/10.1007/BF00984890
Bos N, Grinsted L, Holman L (2011) Wax on, wax off: nest soil facili- tates indirect transfer of recognition cues between ant nestmates. PLoS ONE 6:2–7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019435 Brandt M, Van Wilgenburg E, Tsutsui ND (2009) Global-scale analy- ses of chemical ecology and population genetics in the invasive Argentine ant. Mol Ecol 18:997–1005. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04056.x
Bruneau E (2011) Le frelon asiatique, déjà là. Actu Api 55:1–6 Butler CG, Fletcher DJC, Watler D (1969) Nest-entrance marking with pheromones by the honeybee—*Apis mellifera* L., and by a wasp, *Vespula vulgaris* L. Anim Behav 17:142–147. https://doi.org/10.1016/0003-3472(69)90122-5
Butler CG, Fletcher DJC, Watler D (1970) Hive entrance finding by honeybee (*Apis mellifera*) foragers. Anim Behav 18:78–91. https://doi.org/10.1016/0003-3472(70)90074-6
Couvillon MJ, Caple JP, Endsor SL et al (2007) Nest-mate recogni- tion template of guard honeybees (*Apis mellifera*) is modified by wax comb transfer. Biol Lett 3:228–230. https://doi.org/10.1098/ rsbl.2006.0612
D'Ettorre P, Lenoir A (2010) Nestmate recognition. Ant Ecol 11:194–209. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199544639.003.0011
Darrouzet E (2013) Les Insectes bâtisseurs, nids de termites, de guêpes et de frelons. Connaissances et Savoirs
Darrouzet E (2019) Le frelon asiatique, un redoutable prédateur. Syndicat National d'Apiculture
Darrouzet E, Gévar J (2014) Le frelon asiatique à la conquête de l'Europe. La Santé l'Abeille 259:49–59
Darrouzet E, Lebreton S, Gouix N et al (2010) Parasitoids modify their oviposition behavior according to the sexual origin of conspecific cuticular hydrocarbon traces. J Chem Ecol 36:1092–1100. https://doi.org/10.1007/s10886-010-9845-8
Darrouzet E, Labédan M, Landré X et al (2014) Endocrine control of cuticular hydrocarbon profiles during worker-to-soldier differ- entiation in the termite *Reticulitermes flavipes*. J Insect Physiol 61:25–33. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.12.006
Darrouzet E, Gévar J, Guignard Q, Aron S (2015) Production of early diploid males by European colonies of the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax*. PLoS ONE 10:1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136680
Demichelis S, Manino A, Minuto G et al (2014) Social wasp trapping in north west Italy: comparison of different bait-traps and first detection of *Vespa velutina*. Bull Insectol 67:307–317
Depickère S, Fresneau D, Detrain C, Deneubourg J-L (2004) Mark- ing as a decision factor in the choice of a new resting site in *Lasius niger*. Insectes Soc 51:243–246. https://doi.org/10.1007/ s00040-004-0739-z
Devigne C, Detrain C (2006) How does food distance influence for- aging in the ant *Lasius niger*: the importance of home-range marking. Insectes Soc 53:46–55. https://doi.org/10.1007/s0004 0-005-0834-9
Dronnet S, Lohou C, Christides JP, Bagnères AG (2006) Cuticular hydrocarbon composition reflects genetic relationship among colonies of the introduced termite *Reticulitermes santonensis* Feytaud. J Chem Ecol 32:1027–1042. https://doi.org/10.1007/ s10886-006-9043-x
Edwards R (1980) Social wasps. Their biology and control. Rentok- ild Ltd, East Grinstead
Elia M, Blancato G, Picchi L et al (2017) Nest signature changes throughout colony cycle and after social parasite invasion in social wasps. PLoS ONE 12:1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190018
Errard C, Delabie J, Jourdan H, Hefetz A (2005) Intercontinental chemical variation in the invasive ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera Formicidae): a key to the invasive suc- cess of a tramp species. Naturwissenschaften 92:319–323. https://doi.org/10.1007/s00114-005-0628-y
Espelie KE, Hermann HR (1990) Surface lipids of the social wasp *Polistes annularis* (L.) and its nest and nest pedicel. J Chem Ecol 16:1841–1852. https://doi.org/10.1007/BF01020498
Espelie KE, Wenzel JW, Chang G (1990) Surface lipids of social wasp *Polistes metricus* say and its nest and nest pedicel and their relation to nestmate recognition. J Chem Ecol 16:2229–2241. https://doi.org/10.1007/BF01026933
Fan Y, Schal C, Vargo EL, Bagnères AG (2004) Characterization of termite lipophorin and its involvement in hydrocarbon trans- port. J Insect Physiol 50:609–620. https://doi.org/10.1016/j. jinsphys.2004.04.007
Ferguson ID, Gamboa GJ, Jones JK (1987) Discrimination between natal and non-natal nests by the social wasps *Dolichovespula maculata* and *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). J Kansas Entomol Soc 60:65–69
Florane CB, Bland JM, Husseneder C, Raina AK (2004) Diet-medi- ated inter-colonial aggression in the formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus*. J Chem Ecol 30:2559–2574. https://doi.org/10.1007/s10886-004-7950-2
Fox J (2005) The R commander: a basic-statistics graphical user interface to R. J Stat Softw 14:1–42. https://doi.org/10.1109/ISCAS.2015.7169035
Free JB (1987) Pheromones of social bees. Chapman and Hall, London
Fresneau D, Errard C (1994) L'identité coloniale et sa "représentation" chez les fourmis. Intellectica 2:91–115
Gamboa GJ, Reeve HK, Pfennig DW (1986) The evolution and ontog- eny of nestmate recognition in social wasps. Annu Rev Entomol 31:431–454. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.31.1.431
Gévar J, Bagnères AG, Christidès JP, Darrouzet E (2017) Chemical heterogeneity in inbred European population of the invasive hor- net *Vespa velutina nigrithorax*. J Chem Ecol 43:763–777. https://doi.org/10.1007/s10886-017-0874-4
Gibbs A (1995) Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: model mixtures and lipid interactions. Comp Biochem Physiol Part B Biochem 112B:667–672. https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00119-0
Gibbs A (1998) Water-proofing properties of cuticular lipids. Am Zool 38:471–482. https://doi.org/10.1093/icb/38.3.471

Giraud T, Pedersen JS, Keller L (2002) Evolution of supercolonies: the Argentine ants of southern Europe. Proc Natl Acad Sci USA 99:6075–6079. https://doi.org/10.1073/pnas.092694199
Grosso-silva JM, Maia M (2012) NOTA/NOTE *Vespa velutina* Lepele- tier, 1836 (Hymenoptera, Vespidae), new species for Portugal. Arq Entomoloxicos 6:53–54. https://doi.org/10.7764/onomazein.28.24 Hadley NF (1984) Cuticle: ecological significance. In: Bereiter-Hahn J, Matoltsy AG, Richards KS (eds) Biology of the integument.
Springer, Berlin, pp 685–692
Hamilton W (1987) Discrimination nepotism: expectable, common, overlooked. Kin Recognit Anim, pp 417–437
Haxaire J, Tamisier J-P, Bouget J-P (2006) *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hym., Vespidae). Bull la Société Entomol Fr 111:194–194
Hefetz A (2007) The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae)—interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy. A review. Myrmecol News 10:59–68
Hölldobler B (1995) The chemistry of social regulation: multicompo- nent signals in ant societies. Proc Natl Acad Sci USA 92:19–22. https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.19
Hölldobler B, Carlin NF (1987) Anonymity and specificity in the chem- ical communication signals of social insects. J Comp Physiol A 161:567–581. https://doi.org/10.1007/BF00603662
Holway DA, Case TJ (1999) Mechanisms of dispersed central-place foraging in polydomous colonies of the Argentine ant. Anim Behav 59:433–441. https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1329
Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioral, and bio- chemical aspects of insect hydrocarbons. Annu Rev Entomol 50:371–393. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359
Howard RW, McDaniel CA, Nelson DR et al (1982) Cuticular hydro- carbons of *Reticulitermes virginicus* (Banks) and their role as potential species-and caste-recognition cues. J Chem Ecol 8:1227–1239
Kaib M, Eisermann B, Schoeters E et al (2000) Task-related varia- tion of postpharyngeal and cuticular hydrocarbon compositions in the ant *Myrmicaria eumenoides*. J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol 186:939–948. https://doi.org/10.1007/s003590000 146
Kukuk PF, Breed MD, Sobti A, Bell WJ (1977) The contributions of kinship and conditioning to nest recognition and colony member recognition in a primitively eusocial bee, L*asioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae). Behav Ecol Sociobiol 2:319–327
Laborde-Castérot H, Darrouzet E, Le Roux G et al (2020) Ocular lesions other than stings following yellow-legged hornet (*Vespa velutina nigrithorax*) projections, as reported to French Poison control centers. JAMA Ophthalmol. https://doi.org/10.1001/jamao phthalmol.2020.4877
Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR: an R package for multi- variate analysis. J Stat Softw 25:1–18. https://doi.org/10.18637/ jss.v025.i01
Lebreton S, Christidès JP, Bagnères AG et al (2010) Modifications of the chemical profile of hosts after parasitism allow parasitoid females to assess the time elapsed since the first attack. J Chem Ecol 36:513–521. https://doi.org/10.1007/s10886-010-9781-7
Lengyel F, Westerlund SA, Kaib M (2007) Juvenile hormone III influ- ences task-specific cuticular hydrocarbon profile changes in the ant *Myrmicaria eumenoides*. J Chem Ecol 33:167–181. https:// doi.org/10.1007/s10886-006-9185-x
Lenoir A, Fresneau D, Errard C, Hefetz A (1999) Individual- ity and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. Inf Process Soc Insects. https://doi. org/10.1007/978-3-0348-8739-7_12
Lenoir A, Cuisset D, Hefetz A (2001) Effects of social isolation on hydrocarbon pattern and nestmate recognition in the ant *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera, Formicidae). Insectes Soc 48:101–109. https://doi.org/10.1007/PL00001751
Lenoir A, Depickère S, Devers S et al (2009) Hydrocarbons in the ant *Lasius niger*: from the cuticle to the nest and home range marking. J Chem Ecol 35:913–921. https://doi.org/10.1007/ s10886-009-9669-6
Leza M, Herrera C, Marques A et al (2019) The impact of the inva- sive species *Vespa velutina* on honeybees: a new approach based on oxidative stress. Sci Total Environ 689:709–715. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.511
López S, González M, Goldarazena A (2011) *Vespa velutina* Lepele- tier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae): first records in Iberian Peninsula. EPPO Bull 41:439–441. https://doi.org/10.111 1/j.1365-2338.2011.02513.x
Matsuura K (2001) Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, *Reticulitermes speratus*. Oikos 92:20–26. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.920103.x
Matsuura K (2003) Symbionts affecting termite behavior. In: Bourtzis K, Miller TA (eds) Insect symbiosis. CRC Press, Boca Raton, pp 131–143
Monceau K, Thiéry D (2017) *Vespa velutina* nest distribu- tion at a local scale: an 8-year survey of the invasive honeybee predator. Insect Sci 24:663–674. https ://doi. org/10.1111/1744-7917.12331
Nelson DR (1993) Methyl-branched lipids in insects. In: Stanley-Samu- elson DW, Nelson DR (eds) Insect lipids: chemistry, biochemistry & biology. University of Nebraska Press, Lincoln and London, pp 270–315
Nowbahari E, Lenoir A, Clément JL et al (1990) Individual, geographi- cal and experimental variation of cuticular hydrocarbons of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera: Formicidae): their use in nest and subspecies recognition. Biochem Syst Ecol 18:63–73. https://doi.org/10.1016/0305-1978(90)90036-F
Pedersen JS, Krieger MJB, Vogel V et al (2006) Native supercolonies of unrelated individuals in the invasive Argentine ant. Evolution (N Y) 60:782–791. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01156.x
Perdereau E, Dedeine F, Christidès JP, Bagnères AG (2010) Variations in worker cuticular hydrocarbons and soldier isoprenoid defensive secretions within and among introduced and native populations of the subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*. J Chem Ecol 36:1189–1198. https://doi.org/10.1007/s10886-010-9860-9
Rahman S, Hajong SR, Gévar J et al (2016) Cuticular hydrocarbon compounds in worker castes and their role in nestmate recogni- tion in *Apis cerana indica*. J Chem Ecol 42:444–451. https://doi. org/10.1007/s10886-016-0700-4
Requier F, Antúnez K, Morales CL et al (2018) Trends in beekeep- ing and honey bee colony losses in Latin America. J Apic Res 57:657–662. https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494919
Requier F, Rome Q, Chiron G et al (2019) Predation of the invasive Asian hornet affects foraging activity and survival probability of honey bees in Western Europe. J Pest Sci 92:567–578. https://doi. org/10.1007/s10340-018-1063-0
Robinet C, Suppo C, Darrouzet E (2017) Rapid spread of the invasive yellow-legged hornet in France: the role of human-mediated dis- persal and the effects of control measures. J Appl Ecol 54:205– 215. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12724
Robinet C, Darrouzet E, Suppo C (2018) Spread modelling: a suitable tool to explore the role of human-mediated dispersal in the range expansion of the yellow-legged hornet in Europe. Int J Pest Manag 65:258–267. https://doi.org/10.1080/09670874.2018.1484529
Rome Q, Muller F, Gargominy O, Villemant C (2009) Bilan 2008 de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). Bull la Société Entomol Fr 114:297–302
Rome Q, Muller FJ, Touret-Alby A et al (2015) Caste differentiation and seasonal changes in *Vespa velutina* (Hym.: Vespidae) coloniesin its introduced range. J Appl Entomol 139:771–782. https://doi. org/10.1111/jen.12210
Rottler-Hoermann AM, Schulz S, Ayasse M (2016) Nest wax triggers worker reproduction in the bumblebee *Bombus terrestris*. R Soc Open Sci 3:150599. https://doi.org/10.1098/rsos.150599
Saleh N, Scott AG, Bryning GP, Chittka L (2007) Distinguishing signals and cues: bumblebees use general footprints to generate adaptive behaviour at flowers and nest. Arthropod Plant Interact 1:119–127. https://doi.org/10.1007/s11829-007-9011-6
Scholl J, Naug D (2011) Olfactory discrimination of age-specific hydrocarbons generates behavioral segregation in a honeybee col- ony. Behav Ecol Sociobiol 65:1967–1973. https://doi.org/10.1007/ s00265-011-1206-2
Shelton TG, Grace JK (1997) Impact of low temperature conditioning on intercolonial agonism in *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology 30:197–211
Singer TL (1998) Roles of hydrocarbons in the recognition sys- tems of insects. Am Zool 38:394–405.

https://doi.org/10.1093/ icb/38.2.394
Singer TL, Espelie KE (1992) Social wasps use nest paper hydrocar- bons for nestmate recognition. Anim Behav 44:63–68. https://doi. org/10.1016/S0003-3472(05)80755-9
Smith R-K, Taylor OR Jr (1990) Unsaturated extracted hydrocarbon caste differences between european queen and worker honey bees, A*pis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). J Kansas Entomol Soc 63:369–374
Suarez AV, Tsutsui ND, Holway DA, Case TJ (1999) Behavioral and genetic differentiation between native and introduced populations of the Argentine ant. Biol Invasions 1:43–53
Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2000) Patterns of spread in biologi- cal invasions dominated by long-distance jump dispersal: insights from Argentine ants. Proc Natl Acad Sci 98:1095–1100. https:// doi.org/10.1073/pnas.98.3.1095
Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. Proc Natl Acad Sci USA 97:5948–5953. https://doi.org/10.1073/pnas.100110397
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. Mol Ecol 10:2151–2161
Turillazzi S, Ugolini A (1979) Rubbing behaviour in some European Polistes (Hymenoptera Vespidae). Ital J Zool 13:129–142
Villemant C, Muller F, Haubois S (2011) Bilan des travaux (MNHN et IRBI) sur l'invasion en France de *Vespa velutina*, le frelon asia- tique prédateur d'abeilles. Journée Sci Apic, pp 3–12
Wheeler WM (1911) The ant-colony as an organism. J Morphol 22:307–325
Wilson EO (1971) The insect societies. Harvard Universiry Press, Cambridge
Woodrow RJ, Grace JK, Nelson LJ, Haverty MI (2000) Modifica- tion of cuticular hydrocarbons of *Cryptotermes brevis* (Isop- tera: Kalotermitidae) in response to temperature and rela- tive humidity. Environ Entomol 29:1100–1107. https://doi.org/10.1603/0046-225X-29.6.1100

Mélissa HAOUZI

La communication chimique chez le frelon invasif *Vespa velutina nigrithorax*

Résumé

La communication chimique est au cœur de l'organisation sociale chez les insectes eusociaux. Cette communication, qui implique l'utilisation de divers composés sémiochimiques, permet une communication intra-coloniale performante. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés, chez le frelon invasif *Vespa velutina nigrithorax* à l'acquisition et à la dynamique de deux substances sémiochimiques essentielles au maintien et au bon fonctionnement de la colonie, les hydrocarbures cuticulaires et la phéromone d'alarme. Les résultats acquis au cours de cette thèse démontrent une hétérogénéité chimique de ces composés sémiochimiques, selon la caste des individus, mais aussi selon leur origine coloniale. L'importance des signaux de reconnaissance a été soulignée avec une acquisition rapide du profil cuticulaire. Enfin, l'impact d'un apport d'acides gras insaturés sur le profil cuticulaire des adultes a été démontré, suggérant leur implication dans la voie de biosynthèse de certains composés. Dans son ensemble, cette thèse conforte l'idée que malgré un système de communication chimique dynamique et hétérogène, les frelons possèdent une organisation sociale très élaborée qui participe à leur succès invasif.

Mots clés : Hydrocarbures cuticulaires, phéromone d'alarme, socialité, Vespidae, frelon à pattes jaunes

Abstract

In eusocial insects, the chemical communication is at the heart of their social organisation. This communication, which involves the use of different semiochemical compounds, enables an effective intra-colonial communication. In this thesis, we focused on the acquisition and dynamics of two semiochemical substances essentials for the maintenance and proper functioning of the colony, the cuticular hydrocarbon compounds and the alarm pheromone, in the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax*. Results obtained during this thesis demonstrate the chemical heterogeneity of these both semiochemical compounds, depending on the caste of the individuals, but also according to their colonial origin. The importance of recognition signals was highlighted, with the rapid acquisition of the cuticular profile. Finally, the impact of an intake of unsaturated fatty acids on the cuticular profile of adults was demonstrated, suggesting their involvement in the biosynthesis pathway of some compounds. Overall, this thesis supports the idea that, despite a dynamic and heterogeneous chemical communication system, hornets possess a highly elaborate social organisation that contributes to their invasive success.

Keywords: Cuticular Hydrocarbon Compounds, alarm pheromone, sociality, Vespidae, Yellow-legged hornet